

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004年3月18日 (18.03.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/022753 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C12N 15/12, 福岡市早良区 百道浜 3-5-2 アクアコート 2 番館 101 Fukuoka (JP). 井上 修二郎 (INOUE, Shujiro) [JP/JP]; 〒810-0023 福岡県 福岡市中央区 警固 2-2-4 ユーハイム赤坂南 503号 Fukuoka (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2003/003613
- (22) 国際出願日: 2003年3月25日 (25.03.2003) (74) 代理人: 清水 初志, 外 (SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県 土浦市 卸町 1-1-1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語 (81) 指定国 (国内): CA, JP, US.
- (30) 優先権データ: 特願2002-255442 2002年8月30日 (30.08.2002) JP 規則4.17に規定する申立て:
— すべての指定国のための不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則4.17(v))
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): アンジェス エムジー株式会社 (ANGES MG, INC.) [JP/JP]; 〒560-0082 大阪府 豊中市 新千里東町 1 丁目四番二号 Osaka (JP). 添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 江頭 健輔 (EGASHIRA, Kensuke) [JP/JP]; 〒814-0001 福岡県
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: NOVEL ACTIN-ASSOCIATED CYTOSEKELTON PROTEIN LACS

(54) 発明の名称: アクチン関連新規細胞骨格タンパク質 LACS

(57) Abstract: It is intended to provide a novel actin-associated cytoskeleton protein LACS and a gene encoding this protein.

(57) 要約: 本発明により、アクチン関連新規細胞骨格タンパク質LACS及び該タンパク質をコードする遺伝子が提供される。



WO 2004/022753 A1

明細書

アクチン関連新規細胞骨格タンパク質LACS

技術分野

本発明はアクチン関連新規細胞骨格タンパク質、及び該タンパク質をコードする遺伝子に関する。また、該タンパク質または遺伝子を活性成分として含有する医薬等、本発明のタンパク質及び遺伝子を利用した発明に関する。

背景技術

2種類の一酸化窒素合成酵素(NOS;cNOS(構成型)及びiNOS(誘導型); Bredt and Snyder, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 682-5 (1990); Janssens et al., J. Biol. Chem. 267: 22964 (1992); Lyons et al., J. Biol. Chem. 267: 6370-4 (1992))により血管内皮細胞からアルギニンを基質としてL-シトルリンと共に産生される一酸化窒素(NO) (Moncada and Higgs, Eur. J. Clin. Invest. 21 (4): 361-74 (1991))は心血管系、神経系及び免疫系において種々の生理学的役割を担うメッセンジャー分子である(Griffith et al., J. Am. Coll. Cardiol 12: 797-806 (1998))。NOは、(1)血管内皮細胞を介した血管拡張(Tanner et al., Circulation 83: 2012-20 (1991))、(2)血管内膜肥厚抑制作用(Garg and Hassid, J. Clin. Invest. 83: 1774-7 (1989))、(3)非アドレナリン非コリン神経における血管拡張の媒介、(4)神経細胞死、(5)神経伝達物質としての作用、(6)記憶の長期増強及び長期抑圧、(7)マクロファージや好中球による殺菌作用、(8)膵臓β細胞からのインシュリン放出(Life Science 49: L213-7 (1991))、(9)発癌(Gastroenterology 103: 1260-6 (1992))、(10)血小板凝集阻害作用(Radomski et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5193-7 (1990))等への関与が報告されている。NOは、心血管系においても様々な抗動脈硬化・心保護作用を有し、NO合成阻害薬投与に

- 2 -

より心血管組織に炎症性・増殖性変化、中膜肥厚、血管周囲繊維化・心肥大等の心血管リモデリングを生じる。

L-NAME (N^G -Nitro-L-arginine methyl ester, hydrochloride) は、広く用いられている cNOS 及び iNOS を阻害する NO 合成阻害剤である。ラットへの L-NAME の継続的投与により NO 産生阻害ラットを作製することができる。このようなモデルラットでは、L-NAME 投与から 1 週間以内に血圧上昇と心血管の炎症性増殖性変化 (単球/マクロファージの浸潤、MCP-1 の増加、NF- κ B 活性の上昇等) が生じ、さらに 4 週目以降には心血管リモデリングが認められる。最終的には、心不全、腎不全、脳梗塞等により死に至る。NO 産生阻害ラットの炎症性増殖性変化及び動脈硬化性病変は、アンジオテンシン II (AngII) または MCP-1 の作用を抑制することにより消失することが知られている。

Rho は、細胞と細胞外基質及び血管内皮の接着を制御する低分子量 G タンパク質であり、細胞基質間接着、細胞移動、神経突起の退縮、細胞質分裂、細胞周期の $G_1 \rightarrow S$ 期への進行等の様々な作用を奏する。これらの作用の多くは、アクチン細胞骨格の再編成によるものである。細胞のアクチン細胞骨格は Rho により制御される接着を支点として調節され、細胞の組織内の遊走、細胞間隙の通りぬけを可能としている。Rho は GDP 結合型のときは不活性であり、GTP との結合により活性型となる。GTP 結合型の活性型 Rho は、経路のより下流のエフェクター分子へと作用する。タンパク質リン酸化酵素である Rho 結合キナーゼ (Rho-associated coiled forming protein kinase; ROCK) は、この Rho 下流エフェクターの一つである。Rho によるアクチン細胞骨格の誘導は、細胞周期特異的に異なった場所、そして異なった特異的形態の骨格を作るように行われる。

ROCK は、分子量 160K のセリン・スレオニンリン酸化酵素である。N 末端にキナーゼドメインを、中央部にコイルド・コイル形成領域、そして、C 末端に膜結合ドメインを有している。これまでの解析から、ROCK がいくつかの経路においてアクチン骨格を制御していることが判明している (M. Maekawa et al., Science 285:

- 3 -

895-8 (1999))。その一つが、ミオシン脱リン酸化酵素を不活性化し、さらにミオシン軽鎖を直接リン酸化することによりミオシンを活性化してアクトミオシンの収縮を誘導する経路である。別の経路としては、LIM キナーゼの活性化である。活性化された LIM キナーゼは、アクチン結合タンパク質コフィリンをリン酸化することにより不活性化する。その結果、コフィリンによるアクチン脱重合活性が抑制され、繊維化アクチンが増加する。さらに別の経路としては、1 型 Na^+/H^+ 交換体のリン酸化活性化が挙げられる。活性化により交換体は ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) タンパク質の結合を促進し、アクチンの細胞膜への結合が誘導される。このような経路を経て、ROCK は細胞膜に結合したアクトミオシン束の形成に寄与していると考えられている。

発明の開示

本発明者等は、NO による心血管リモデリングの変化が心臓組織局所のアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 活性の増加により生じ、ACE 阻害薬及びアンジオテンシン II 受容体 (AT1R) 拮抗薬によりほぼ完全に抑制できることを報告してきた。しかしながら、局所におけるレニンアンジオテンシン系 (RAS) が活性化する機序、シグナリング以降の心血管の構築変化の機序等については依然として不明な点が多い。心血管病変を形成する上で重要な役割を果たす遺伝子の解明が望まれる。このような遺伝子、及び該遺伝子によりコードされるタンパク質は心疾患の予防・治療の面でも重要と考えられる。

本発明者らは心血管病変の形成において重要な役割を果たす新規遺伝子の単離と同定を目標とした。そこで、まず、心血管病変部位で発現が亢進している遺伝子に着目し、特に心臓局所において発現の亢進している遺伝子のサブトラクション法 (Swaroop et al., Nucleic Acids Res. 19: 1954 (1991) 参照) による単離を試みた。その結果、NO 合成酵素阻害薬である L-NAME 投与後に心臓で発現が増加している全長約 12kb の新規遺伝子を cDNA ライブラリーのスクリーニングにより

- 4 -

単離した。得られた新規遺伝子を LACS (L-NAME related ActinCytoSkeletal protein) 遺伝子と名付けた。ノーザンブロット解析の結果、該遺伝子の発現は、心臓及び骨格筋に認められた。そして、特に心臓では、心筋細胞で mRNA が多く発現していることが確認された。細胞内での分布を見ると、アクチンストレスファイバーの一部に共局在して発現されていた。免疫沈降によりアクチンファイバーと（直接または間接的に）結合していることが示され、分画からも骨格分画に属していることがウェスタンブロットにより示された。さらに、該遺伝子の塩基配列から予測されたアミノ酸配列について、機能・属性等についての推測を行った。その結果、シグナル配列、膜貫通領域等の特徴的配列は認められなかった。しかしながら、C 末端側にはプロリンに富む配列が存在し、SH3 結合ドメインに対して相同性を示すことが明らかとなった。

以上の結果、また、その遺伝子サイズが大きいこと等からも、LACS は細胞骨格に関係する構造タンパク質であることが示された。LACS mRNA は複数の高血圧・心肥大モデル動物 (L-NAME ラット、AngII infusion ラット、高血圧自然発症ラット (SHR)) の心臓で血圧非依存性に高発現していた。また、培養心筋細胞においては肥大性アゴニスト刺激により LACS mRNA 発現の増加が認められた。さらに、その発現メカニズムに AngII-AT1R 経路、Rho/ROCK 系が関与していることが示唆された。そして、LACS の発現は肥大性刺激によってアクチンに沿って増加し、アクチンと直接的または間接的に結合し、アクチンの機能調節を行うことによってアクチンファイバーの再編 (reorganization) に関与していると考えられた。上述のようなアンジオテンシン (AngII)、Phenylephrine、エンドセリン-1 等による mRNA 発現の増加は、LACS 発現の少なくとも一部が G タンパク質連結型レセプター以降のシグナリングにより制御されていることを示唆するものである。

このような、高血圧及び心肥大モデル動物で高発現し、肥大性アゴニスト刺激により培養心筋細胞で発現が増加する遺伝子であって、さらにアクチン重合調節に関係することが示唆されたタンパク質をコードする該遺伝子は、心不全、心肥

大、心筋炎、心筋症、動脈硬化、閉塞性動脈硬化症、または虚血性心疾患等の心疾患に対する医薬になると期待される。

従って、本発明は、

- (1) 以下の(a)～(d)より選択されるタンパク質、
 - (a) 配列番号: 1 記載のアミノ酸配列を含むタンパク質
 - (b) 配列番号: 1 記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加及び/または挿入により改変されたアミノ酸配列を含むタンパク質
 - (c) 配列番号: 2 記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを含むタンパク質
 - (d) 配列番号: 1 記載のアミノ酸配列と、60%の相同性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質
- (2) (1) 記載のタンパク質、またはその一部をコードするポリヌクレオチド、
- (3) 配列番号: 2 記載の塩基配列を含む、(2) 記載のポリヌクレオチド、
- (4) (1) 記載のタンパク質を含む医薬、
- (5) 心不全、心肥大、心筋炎、心筋症、動脈硬化、閉塞性動脈硬化症、または虚血性心疾患の予防、改善、または治療に用いられる(4) 記載の医薬、
- (6) (2) 記載のポリヌクレオチドを含む医薬、
- (7) 心不全、心肥大、心筋炎、心筋症、動脈硬化、閉塞性動脈硬化症、または虚血性心疾患の予防、改善、または治療に用いられる(6) 記載の医薬、を提供するものである。

本発明により、心血管病変において重要な役割を果たす新規遺伝子 LACS が提供される。LACS cDNA の塩基配列を配列番号: 2 に、該塩基配列より予想される該 cDNA によりコードされる LACS タンパク質のアミノ酸配列を配列番号: 1 に示す。

本発明のタンパク質は、配列番号: 1 記載のアミノ酸配列を含むタンパク質である。該タンパク質は例えば、該タンパク質に対する抗体を結合したアフィニティークロマトグラフィー等により、該タンパク質を産生する細胞より得ることができる。また、LACS タンパク質の分子量 (373kDa) 、及びアクチンとの結合性に基づいて、公知のタンパク質精製技術により精製することも可能である。LACS タンパク質は培養心筋細胞からの発現が L-NAME 投与により誘導できることから、L-NAME により誘導した LACS タンパク質は、塩析 ; ゲル濾過、イオン交換、逆相、アフィニティー、疎水性、吸着等のクロマトグラフィー ; ゲル電気泳動 ; 限外濾過 ; 再結晶 ; 蒸留 ; 透析 ; 等電点電気泳動 ; フィルター濾過 ; 免疫沈降 ; 溶媒抽出 ; 溶媒沈澱等により単離、精製可能である (ed. Marshak et al., *Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual*, Cold Spring Harbor Press (1996) 参照)。

さらに、このような配列番号: 1 記載のアミノ酸配列を含むタンパク質には、融合タンパク質が含まれる。融合タンパク質としては、遺伝子組換え技術により該タンパク質を発現させた場合に、その精製を容易にするために宿主細胞からの分泌を指示するシグナル配列を本発明のタンパク質に付加したもの、並びに、回収を容易にする FLAG、ヒスチジン残基から成るもの等のタグ、及び検出のための GFP 等のタグを付加した融合タンパク質を例示することができる。このような融合タンパク質においては、本発明のタンパク質に相当する以外の部分を必要に応じて削除できるよう、周知技術に基づきトロンビンまたはファクターXa 等により切断可能なように作成することも可能である。

本発明のタンパク質はまた、該配列番号: 1 記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加及び挿入により改変されたアミノ酸配列を含むタンパク質である。このようなタンパク質は、配列番号: 1 記載のアミノ酸配列からなるタンパク質をコードするポリヌクレオチドを慣用の遺伝子技術により改変、発現させることにより得ることができる。遺伝子を改変する技術とし

- 7 -

ては、例えば、部位特異的変異誘発法(ed. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, publish. John Wiley & Sons, section 8.1-8.5 (1987))を挙げることができる。このように改変されたタンパク質もまた必要に応じて上述したように融合タンパク質とすることができる。

さらに、本発明のタンパク質は、配列番号: 2 記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを含むタンパク質である。このようなタンパク質は、例えば、配列番号: 2 記載の塩基配列に基づいて作成したプローブを基に哺乳動物由来の cDNA ライブラリー、ゲノムライブラリー等をハイブリダイゼーション法(ed. Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, publish. John Wiley & Sons, section 6.3-6.4 (1987))によりスクリーニングして得たポリヌクレオチドを発現させて得ることができる。しかしながら、本発明の「配列番号: 2 記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド」という記載は、このようなポリヌクレオチドの製造方法をハイブリダイズ法に得られるものに限定することを意図したものではない。従って、前述の部位特異的変異等の技術により作成することができるポリヌクレオチドであっても、配列番号: 2 記載の塩基配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズするものであれば該定義に包含される。ここで、「ストリンジェントな条件下」とは、洗浄時の条件を低塩濃度または高温とした条件であり、例えば 1×SSC、0.1%SDS、37℃（あるいは 55℃）等の条件を示すことができる。

また、本発明のタンパク質には、配列番号: 1 記載のアミノ酸配列と、50%以上、好ましくは 70%以上、さらに好ましくは 80%以上、より一層好ましくは 90%以上、そして最も好ましくは 95%以上（例えば、96、97、98、99%以上）の相同性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質が包含される。このようなタンパク質は、上述の部位特異的変異法及びハイブリダイゼーション法、PCR 法(ed. Ausubel et

al., Current Protocols in Molecular Biology, publish. John Wiley & Sons, section 6.1-6.4 (1987))等により得ることができる。本発明の相同性は、アルゴリズム BLAST(Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-7 (1993))により決定される。BLAST アルゴリズムに基づいて開発された BLASTX(Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403-10 (1990))等のプログラムが知られている。具体的な解析手法については、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> を参照することができる。

本発明の LACS タンパク質は、複数の高血圧・心肥大モデル動物の心臓において高発現しており、NO 合成阻害剤 L-NAME の投与により心臓局所において発現の上昇する遺伝子によりコードされる。従って、該タンパク質の発現に基づき NOS の発現または活性の阻害を検出することができ、NOS の発現または活性低下により誘起される疾患の診断が可能となる。このようなタンパク質の発現は、これに限定される訳ではないが、該タンパク質に対する抗体を用いて検出することができる。本発明のタンパク質に対する抗体は、配列番号: 1 記載のアミノ酸配列からなるタンパク質は当然ながら、該タンパク質の抗原性を有する上述の本発明のタンパク質、並びに、該タンパク質の一部を用いて慣用手段により作成することが可能である。従って、本発明のタンパク質及びその一部であるペプチド断片は、NOS の発現または活性低下により誘起される疾患の診断を可能とする抗体の作成にも使用することができる。本発明のタンパク質をヒトへの医薬として用いる場合、これに限定される訳ではないがヒト由来の LACS タンパク質を用いることが望ましい。ヒト由来の LACS タンパク質は、本発明の LACS タンパク質及び遺伝子の配列情報を基にプローブまたはプライマーを作成し、上述したハイブリダイズ法、種々の PCR 法を用いて所望のタンパク質をコードする遺伝子を取得し、発現させることにより得ることができる。

また、本発明のタンパク質は、配列番号: 1 記載のアミノ酸配列からなるタンパク質と同等の機能を有するタンパク質を含む。本明細書中、「配列番号: 1 記載の

アミノ酸配列からなるタンパク質と同等の機能を有する」とは、アクチンの重合、架橋、束形成を促進または抑制する活性を有することを意味する。このような配列番号: 1 記載のアミノ酸配列からなる LACS タンパク質と同等の機能を有するタンパク質は、上述の部位特異的変異法、ハイブリダイズ法、PCR 法等を利用して得られるタンパク質を含むものである。

さらに、本発明により、本発明のタンパク質またはその一部をコードするポリヌクレオチドが提供される。このようなポリヌクレオチドには、cDNA、ゲノム DNA、mRNA、並びに、化学合成 DNA 及び RNA 等が含まれる。本発明のタンパク質の一つをコードするポリヌクレオチドは、遺伝暗号に縮重が存在することから複数考えられるが、本発明のポリヌクレオチドにはそれらの縮重が包含される。本発明のポリヌクレオチドは例えば、配列番号: 2 記載の本発明の LACS タンパク質をコードする塩基配列全部、またはその一部を基にプローブ、プライマー等を作成し、ハイブリダイゼーション法、PCR 法等の周知技術に基づいて天然由来の本発明のポリヌクレオチドを得ることができる。さらに必要に応じ、得られたポリヌクレオチドを制限酵素による消化、部位特異的変異誘発法、適当な断片(リンカー、開始コドン、終止コドンを含む)の付加等により改変したり、融合タンパク質を発現可能なように他のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと連結したり、または、適当なベクター(発現ベクター、クローニングベクター等)に組み込んだポリヌクレオチドも本発明のポリヌクレオチドに含まれる。

さらに、本発明は、配列番号: 2 記載の塩基配列、またはその相補鎖の連続する配列に対して相補的な少なくとも 13 塩基を含むポリヌクレオチドを提供する。このような相補的なポリヌクレオチドは、配列番号: 2 記載の塩基配列またはその相補鎖に対して完全に相補的である必要はなく、少なくとも 70%以上、好ましくは 80%以上、さらに好ましくは 90%以上、より一層好ましくは 95%以上の相同性を有するものであればよい。相同性の決定は、前述した方法に従って行うことができる。このようなポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質をコードする DNA や

mRNA の検出、増幅にプローブまたはプライマーとして用いることができる。プライマーとして使用する場合には、必要に応じ、例えば 5' 末端に制限酵素認識配列及び/またはタグ等を付加することもできる。また、アンチセンスヌクレオチド、リボザイム等としても使用し得る。アンチセンスヌクレオチド及びリボザイムは、本発明のタンパク質の発現を阻害または抑制するのに用いることができる。

本発明のポリヌクレオチドを適当な発現ベクターのエンハンサー、プロモーター等を含む発現制御領域下に組み込み、適当な宿主細胞に導入することにより本発明のタンパク質を得ることができる。宿主細胞としては、原核細胞及び真核細胞が挙げられる。原核細胞としては大腸菌を用いる系が良く知られている。大腸菌を宿主とした場合のプロモーターとしては、例えば lacZ プロモーター (Ward et al., Nature 341: 544-6 (1998))、ara プロモーター (Better et al., Science 240: 1041-3 (1988)) が挙げられる。本発明のタンパク質を大腸菌を宿主として遺伝子工学的手法により製造する場合、精製をより簡便にするために、ペリプラズムへの産生を可能にするシグナル配列を付加することが望ましい。シグナル配列としては、pelB シグナル配列 (Lei et al., J. Bacteriol. 169: 4379 (1987)) が例示される。その他、大腸菌用の発現ベクターは SV40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス等由来の複製起点、アミノグリコシドトランスフェラーゼ遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、キサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等の選択マーカーを含むことができる。大腸菌以外、枯草菌を宿主とした原核細胞発現系も公知である。

真核細胞宿主としては、酵母細胞系、植物細胞系、昆虫細胞、両生類細胞、哺乳動物を含む動物細胞系が知られている。汎用される酵母細胞系としては、サッカロミセス属の酵母、アスペルギルス属の糸状菌を宿主とした系が挙げられる。植物細胞系では、ニコチナ・タバカム由来の細胞を宿主とする系が知られている。植物細胞系では、カルス培養によるタンパク質の産生のみならず、所望の遺伝子

- 11 -

を導入した細胞から植物体を再生し、植物の葉、根、茎等より目的とするタンパク質を得ることも可能である(Julian et al., Eur. J. Immunol. 23: 131-8 (1994))。哺乳動物細胞としては、BHK、CHO、COS、HeLa、ミエローマ、3T3 等がある。両生類細胞としては、アフリカツメガエル卵母細胞(Valle et al., Nature 291: 358-40 (1981))が知られており、昆虫細胞としては Sf9、Sf21、Tn5 等が公知である。構築したベクターは、リン酸カルシウム法(Virology 52: 456-67 (1973))、エレクトポーション法(EMBO J. 1: 841-5 (1982))等の公知の方法により宿主へ導入する。

また、動物を使用して本発明のタンパク質を *in vivo* で産生させることもできる(Lubon, Biotechnol. Annu. Rev. 4: 1-54 (1998)参照)。動物としては、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ(Ebert et al., Bio/Technology 12: 699-702 (1994))等の家畜及びマウス等の哺乳動物、並びに、カイコのような昆虫を挙げることができる。哺乳動物における外来タンパク質の産生では、目的とするタンパク質をコードする DNA を β カゼイン等の乳汁中に特異的に分泌されるタンパク質をコードする遺伝子との融合遺伝子とする。次に、該融合遺伝子を動物の胚へ注入し、染色体上への組換えを起こさせる。この胚を雌の動物の子宮へ移植することにより生まれてくるトランスジェニック動物、またはその子孫から得られる乳汁中からの目的タンパク質の取得が可能となる。一方、カイコでは、所望のタンパク質をコードする遺伝子をバキュロウイルスに組み込み、該バキュロウイルスを用いてカイコを形質転換することにより、所望タンパク質をカイコの体液から得ることができる(Susumu et al., Nature 315: 592-4 (1985))。

遺伝子工学的手法により宿主内に、または、宿主より分泌されたタンパク質は、天然のタンパク質の場合と同様に精製することができる。精製を簡便にする等の便宜として任意に修飾を加えたタンパク質については、タンパク質の精製前または後に適当なタンパク質修飾酵素を作用させ修飾したペプチド部分を除去することもできる。

- 12 -

本発明のタンパク質またはその一部を用いて、本発明のタンパク質に対する抗体を得ることもできる。本明細書中における抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体(Milstein et al., Nature 305: 537-40 (1983))及び抗体断片を含むものである。本発明のタンパク質に対するポリクローナル抗体は、例えば、本発明のタンパク質の抗原となる部分を感じ作した哺乳動物の血液から得た血清であり得る。また、該血清をさらに精製し、ポリクローナル抗体を含む画分とすることもできる。一方、モノクローナル抗体は、抗原を感じ作した哺乳動物から免疫細胞を取り出し、骨髓腫細胞等の永久増殖能を有する細胞と融合させたハイブリドーマをクローニングし、その培養物よりモノクローナル抗体を回収するハイブリドーマ法(Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975))により製造できる。

また、抗体断片とは抗体の抗原結合領域または可変領域を含む断片のことである。Fab、Fab'、F(ab')₂及びFv断片等が挙げられる。Fabとは抗体分子のパパイン消化により得られる断片である。また、抗体のペプシン消化によつては、F(ab')₂断片を得られる。その他の抗体断片としては、ダイアボディー(Holliner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-8 (1993))、線状抗体、scFVのような一本鎖抗体(Plucktun, "The Pharmacology of Monoclonal Antibody", Vol. 113, ed. Rosenberg and Moore, Springer Verlag, pp.269-315 (1994))、多特異性抗体(LeDoussal et al., Int. J. Cancer Suppl. 7: 58-62 (1992); Paulus, B ehring Inst. Mitt. 78: 118-32 (1985); Millstein and Cuello, Nature 305: 537-9 (1983); Zimmermann, Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 105: 176-260 (1986); Van Dijk et al., Int. J. Cancer 43: 944-9 (1989))等が挙げられる。さらに、本発明の抗体はポリエチレングリコール等の分子により修飾してもよい。作成された抗体は、その他のタンパク質の精製の場合と同様の方法により精製することができる(ed. Harlow and David Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。

本発明のタンパク質は、心筋細胞特異的に発現し、左室肥大等の病的状態に伴

って増加するため、例えば、心不全、心肥大、心筋炎、心筋症、動脈硬化、閉塞性動脈硬化症、または虚血性心疾患等の心疾患の予防、改善、または治療に用いることができる。従って、本発明のタンパク質の機能を増加させたり、制御することによって、これらの心疾患の予防剤、改善剤、または治療剤として製剤化することができる。タンパク質を医薬として使用する場合、タンパク質を直接、単独で患者に投与する形態とすることもできるが、公知の製剤法により製剤化して用いてもよい。そのような方法としては、例えば、PBS 等の中性溶液へ溶解した形態が挙げられる。さらに必要に応じ、薬学的に許容される安定剤、緩衝剤、甘味剤、希釈剤、矯味剤、増量剤、着色剤、乳化剤、賦形剤、崩壊剤、芳香剤、保存剤、溶解補助剤等を添加してもよい。担体を併用することにより、本発明のタンパク質を液剤、エリキシル剤、カプセル剤、顆粒剤、丸剤、懸濁剤、散剤、錠剤、シロップ剤、注射剤、トローチ、乳剤等の形態に調製することができる。

このような本発明のタンパク質を含む医薬の投与量は、患者の体重、年齢、症状等、及び投与方法、投与形態等の諸要因により異なるが、当業者であれば適当な投与量を設定することができる。投与は例えば、皮下投与、経口投与、動脈内注射、静脈内注射等により行うことができる。該タンパク質は、成人(体重 60kg とした場合)で一日当たり、通常 $1\mu\text{g}\sim 10\text{g}$ 、好ましくは $10\mu\text{g}\sim 1\text{g}$ 、より好ましくは $100\mu\text{g}\sim 100\text{mg}$ の投与を行うことが考えられる。また、ヒト以外の動物への投与を行う場合には、体重当たりで計算される投与量を与えることができる。

本発明のタンパク質に代えて、該タンパク質をコードするポリペプチドを医薬として用いることも可能である。このような遺伝子を有効成分とした医薬は、本発明のタンパク質を含む医薬と同様に心不全、心肥大、心筋炎、心筋症、動脈硬化、閉塞性動脈硬化症、虚血性心疾患等の心疾患の予防、改善、または治療に用いることができる。以下に、本発明のポリヌクレオチドを用いた遺伝子治療における遺伝子導入法、導入形態及び導入量について詳述する。

本発明の LACS 遺伝子を有効成分とする遺伝子治療剤を患者に投与する方法は、

非ウイルスベクターを用いる方法と、ウイルスベクターを用いる方法の2つに大別できる。実験手引書等にベクターの調製法、投与法等が詳しく解説されている(別冊実験医学、遺伝子治療の基礎技術、羊土社(1996);別冊実験医学、遺伝子導入&発現解析実験法、羊土社(1997);日本遺伝子治療学会編、遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ティー・エス(1999))。

慣用の非ウイルス遺伝子発現ベクターに目的とする遺伝子が組み込まれた組換え発現ベクターを用いて、以下のような手法により目的遺伝子を細胞及び組織に導入することができる。細胞への遺伝子導入法としてはリポフェクション法、リン酸-カルシウム共沈法、DEAE-デキストラン法、微小ガラス管を用いたDNAの直接注入法等が挙げられる。また、組織への遺伝子導入法としてはウイルス-エンベロープ法、内包型リポソーム(internal type liposome)による遺伝子導入法、静電気型リポソーム(electrostatic type liposome)による遺伝子導入法、HVJ-リポソーム法、改良型HVJ-リポソーム法(HVJ-AVE リポソーム法)、レセプター介在性遺伝子導入法、パーティクルガンで担体(金属粒子)と共にDNA分子を細胞に移入する方法、naked-DNAの直接導入法、正電荷ポリマーによる導入法等のいずれかの方法により組換え発現ベクターを細胞内に取り込ませることができる。

このうちHVJ-リポソームは脂質二重膜で作られたリポソーム中にDNAを封入し、さらにこのリポソームを不活性化したセンダイウイルス(Hemagglutinating virus of Japan; HVJ)とを融合させたものである。当該HVJ-リポソーム法は従来のリポソーム法と比較して、細胞膜との融合活性が非常に高いことを特徴とするものであり、特に好ましい導入形態の一つである。HVJ-リポソームの調製法については、別冊実験医学『遺伝子治療の基礎技術』(羊土社(1996))、別冊実験医学『遺伝子導入&発現解析実験法』(羊土社(1997))、J. Clin. Invest. 93: 1458-64 (1994)、Am. J. Physiol. 271: R1212-20 (1996)等に詳しく述べられている。またHVJリポソーム法とは、例えば、Molecular Medicine 30: 1440-8 (1993)、実験医学 12: 1822-6 (1994)、蛋白質・核酸・酵素 42: 1806-13 (1997)等に記載の方法

であり、好ましくはCirculation 92(Suppl. II): 479-82 (1995)に記載の方法が挙げられる。

また、本発明の LACS 遺伝子の投与において特に好ましい方法としてウイルス-エンベロープを用いる方法を挙げることができる。ウイルス-エンベロープは精製されたウイルスに所望の発現ベクターを界面活性剤存在下で混和するか、または、ウイルスと発現ベクターとの混和液を凍結融解することにより調製することができる(特開 2001-286282 号公報)。

ウイルス-エンベロープ法において用いることができるウイルスとしては、例えば、レトロウイルス、トガウイルス、コロナウイルス、フラビウイルス、パラミクソウイルス、オルトミクソウイルス、プニヤウイルス、ラブドウイルス、ポックスウイルス、ヘルペスウイルス、バキュロウイルス、ヘパドナウイルス等の科に属するウイルス、中でも好ましくはHVJが挙げられる。ここで、ウイルスとしては、野生型及び組換え型のいずれのウイルスを用いることができる。特にHVJとしては、Hasan M. K. ら(J. General Virol. 78: 2813-20 (1997))、またはYonemitsu Y. ら(Nature Biotech. 18: 970-3 (2000))等により報告されている組換え型のHVJを用いることもできる。

一般に、HVJ-リボソーム法及びHVJ-エンベロープ法において用いるHVJとしてはZ株(ATCCより入手可能)が好ましいが、基本的には他のHVJ株(例えば、ATCC VR-907やATCC VR-105等)も用いることができる。また、ウイルスエンベロープを調製する際に、精製されたウイルスをUV照射等により不活性化した後、所望の発現ベクターを混和してもよい。ウイルスと発現ベクターを混和する際に用いることができる界面活性剤としては、例えば、オクチグルコシド、Triton X-100、CHAPS、NP-40等が挙げられる。このようにして調製されたウイルスエンベロープベクターは、注射等により治療、予防または改善の標的となる組織に導入することができる。また、-20℃で凍結することにより、少なくとも2~3ヶ月保存することも可能である。

ここで用いることができ発現ベクターとしては、生体内で目的遺伝子を発現させることのできるベクターであれば如何なる発現ベクターであっても良い。例えば pCAGGS (Gene 108: 193-200 (1991))、pBK-CMV、pcDNA3.1 (Invitrogen)、pZeoSV (Stratagene) 等の発現ベクターを例示することができる。

ウイルスベクターとしては、組換えアデノウイルス、レトロウイルス等のウイルスベクターを用いた方法が代表的である。より具体的には、例えば、無毒化したレトロウイルス、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス、ポックスウイルス、ポリオウイルス、シンプスウイルス、センダイウイルス、SV40、免疫不全症ウイルス (HIV) 等の DNA ウイルスまたは RNA ウイルス (Pharmacol. Ther. 80: 35-47 (1998); Front. Biosci. 4: E26-33 (1999); J. Recep. Signal. Transduct. Res. 19: 673-86 参照) に目的とする遺伝子を導入し、細胞に組換えウイルスを感染させることによって細胞内に遺伝子を導入することができる。前記ウイルスベクターのうち、アデノウイルスの感染効率が他のウイルスベクターを用いた場合よりもはるかに高いことが知られており、この観点からはアデノウイルスベクター系を用いることが好ましい。

本発明の遺伝子治療剤の患者への導入法としては、遺伝子治療剤を直接体内に導入する *in vivo* 法及び患者からある種の細胞を取り出して体外で遺伝子治療剤を細胞に導入し、その細胞を体内に戻す *ex vivo* 法が挙げられる (日経サイエンス、1994 年 4 月号: 20-45; 月刊薬事 36(1): 23-48 (1994); 実験医学増刊 12(15): (1994); 日本遺伝学治療学会編 遺伝子治療開発研究ハンドブック、エヌ・ティー・エス (1999))。本発明では、*in vivo* 法が特に好ましい。

製剤形態としては、上記の各投与形態に合った種々の製剤形態 (例えば液剤等) を取り得る。例えば有効成分である遺伝子を含有する注射剤として製剤する場合、このような注射剤は定法により調製することができ、例えば適切な溶剤 (PBS 等の緩衝液、生理食塩水、滅菌水等) に溶解した後、必要に応じてフィルター等で濾過

滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することにより調製することができる。必要に応じて、注射剤には慣用の担体等を加えても良い。また、HVJ-リポソーム等のリポソーム製剤としては、懸濁剤、凍結剤、遠心分離濃縮凍結剤等の形態が挙げられる。

このような本発明のポリヌクレオチドを含む医薬の投与量は、患者の体重、年齢、症状等、及び投与方法、投与形態等の諸要因により異なるが、当業者であれば適当な投与量を設定することができる。投与は例えば、皮下投与、経口投与、動脈内注射、静脈内注射等により行うことができる。該ポリヌクレオチドは、成人(体重 60kg とした場合)で一日当たり、通常 $1\mu\text{g}\sim 10\text{g}$ 、好ましくは $10\mu\text{g}\sim 1\text{g}$ 、より好ましくは $100\mu\text{g}\sim 100\text{mg}$ の投与を行うことが考えられる。また、ヒト以外の動物への投与を行う場合には、体重当たりで計算される投与量を与えることができる。

特に、本発明のポリヌクレオチドを HVJ-エンベロープ法により投与する場合には、反復して投与を行うことが可能であることから、1 回のみ投与するのではなく、より良い治療、予防または改善効果を得るために複数回、例えば 2、3 回にわたって遺伝子の投与を行うことができる。このような HVJ エンベロープを用いた複数回にわたる投与も本発明に包含される。

本発明のタンパク質またはポリヌクレオチドを含む医薬は、治療目的の疾患、症状に応じた適当な投与方法及び投与部位が選択される。投与方法は限定されないが、心筋内投与または筋肉投与が好ましい。

本発明の LACS 遺伝子は複数の高血圧・心肥大のモデル動物の心臓での増加が認められたことから、患者における高血圧、心肥大の有無についての診断を行うために使用することができる。このような診断は、本発明の LACS 遺伝子の配列情報を基に作成したプローブまたはプライマー等を用いて該遺伝子より転写された細胞内の mRNA を検出することにより行うことが考えられる。生体試料からの mRNA の抽出は市販のキット(例えば、mRNA Purification Kit (Pharmacia); QuickPrep

mRNA Purification Kit (Pharmacia)等)も利用できる。その他、グアニジン超遠心法(Chirgwin et al., Biochemistry 18: 5294-9 (1979))、AGPC 法(Chomczynski and Sacchi, Anal. Biochem. 162: 156-9 (1987))等の総 RNA 調製法が周知である。他方、該遺伝子より発現されたタンパク質を、前述の本発明のタンパク質に対する抗体を用いて検出する方法も考えられる。細胞における指標遺伝子の発現について調べる場合、その発現レベルは通常、細胞の状態に関わらず発現レベルが大きく変動しない遺伝子(ハウスキーピング遺伝子、例えば、 β アクチン、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)等がよく用いられる)の発現レベルの測定値に基づいて補正される。

本発明の LACS タンパク質及び LACS 遺伝子は、心血管系の疾患に対する医薬となり得る化合物のスクリーニング用いることができる。本発明において示されたように、LACS タンパク質は NO 合成阻害薬または肥大性アゴニストの投与に応答して生体内での発現が増大する。従って、LACS タンパク質に対して結合する化合物は、心血管系の疾患に対する医薬の候補となり得る。このような化合物は、例えば、

- (1) 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドに被験化合物を接触させ、
- (2) 該タンパク質またはその部分ペプチドと被験化合物との結合を検出し、そして
- (3) 該タンパク質またはその部分ペプチドに結合する被験化合物を選択することによりスクリーニングすることができる。

または、上記(1)における本発明のタンパク質またはその部分ペプチドとの接触に代えて、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを発現可能に保持する宿主細胞、または宿主細胞の培養物と接触させ、本発明のタンパク質と被験化合物との結合を調べることもできる。

本発明において、LACS タンパク質はアクチンと結合していることが示された。LACS タンパク質とアクチンの結合を阻害することにより、アクチンの重合を促進または抑制することができると考えられる。従って、LACS タンパク質とアクチン

の結合を阻害する化合物は、心血管系の疾患に対する医薬の候補となり得る。LACS タンパク質の結合を阻害する化合物のスクリーニングでは、該タンパク質とアクチンとの結合を指標とすることができる。より具体的には、例えば、

(1) 本発明のタンパク質またはその部分ペプチドと被験化合物をアクチン存在下で接触させ、

(2) 該タンパク質またはその部分ペプチドとアクチンとの結合を検出し、そして

(3) 該タンパク質またはその部分ペプチドとアクチンとの結合を抑制または阻害する被験化合物を選択することにより、そのような化合物をスクリーニングすることができる。ここで、部分ペプチドを用いる場合には、該部分ペプチドは LACS タンパク質のアクチンとの結合に関与している部分を含む必要がある。このような部分ペプチドは、LACS タンパク質を消化して作成した種々の断片についてアクチンとの結合性を調べることによって容易に取得することができる。また、LACS タンパク質とアクチンとの結合は、これに限定される訳ではないが、実施例 7 において示すような LACS 抗体及びアクチン抗体を用いた方法により行うことが可能である。

また、本発明により本発明のタンパク質の発現を制御する化合物をスクリーニングする方法が提供される。LACS タンパク質の発現を促進または抑制する化合物は、心血管系の疾患に対する医薬となり得る。このようなスクリーニングは、LACS 遺伝子を発現する心筋細胞、平滑筋細胞を用いて次のようにして行うことができる。

(1) LACS 遺伝子を発現する細胞に被験化合物を接触させる、

(2) LACS 遺伝子の発現を検出し、そして

(3) 被験化合物が存在しない場合と比べて LACS 遺伝子の発現を促進または抑制する被験化合物を選択する。

LACS 遺伝子の発現には、大腸菌、酵母、昆虫細胞、植物細胞、卵細胞、哺乳動物細胞等、種々のものを利用し得る。前述の患者の生体内における LACS 遺伝子の

- 20 -

発現の検出と同様に、転写された mRNA、タンパク質を慣用の手法に従って検出することができる。

また、LACS 遺伝子を発現する細胞に代えて、LACS 遺伝子の上流域の発現制御配列にレポーター遺伝子を作動可能に連結させた発現ベクターにより形質転換された細胞を使用することもできる。LACS 遺伝子の上流域の発現制御配列とは、プロモーター、エンハンサー及び CAAT ボックス、TATA ボックス等が挙げられる。例えば、配列番号: 2 記載の塩基配列を基にプローブを作成し、ゲノム DNA ライブラリーをスクリーニングすることにより LACS 遺伝子の発現制御配列を含むゲノム DNA クローンを取得する。このクローン中の発現制御配列部分を制限酵素処理等により切り出し、適当なレポーター遺伝子の上流に作動可能に連結されるようにクローニングする。レポーター遺伝子としては、CAT(chloramphenicol acetyltransferase)遺伝子、lacZ 遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、GFP(Green Fluorescent Protein)遺伝子、成長ホルモン遺伝子等が例示される。得られた LACS 遺伝子の発現制御配列下にレポーター遺伝子が連結された構築物は、上述した何れかの方法により適当な宿主細胞(好ましくは、哺乳動物細胞)に導入して使用する。宿主細胞の染色体への該構築物の挿入を意図する場合には、相同組換えを利用することができる。

レポーター遺伝子の発現は、採用したレポーター遺伝子の種類に適した方法に従って検出する。例えば、CAT 遺伝子を用いた場合には、遺伝子発現産物によるクロラムフェニコールのアセチル化を検出して、CAT 遺伝子発現量を測定する。また、lacZ 遺伝子を使用する場合には、遺伝子発現産物中の色素化合物の発色触媒作用を発現量の指標として測定する。レポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である場合には、遺伝子発現産物の触媒作用により生じる蛍光化合物の蛍光を検出し、その発現量の指標とすることができる。GFP タンパク質は蛍光を発することから、GFP 遺伝子をレポーター遺伝子とした場合には、発現産物中の蛍光量により発現量を測定する。成長ホルモン遺伝子を使用した場合は、遺伝子発現産

物の細胞への効果(成長促進、増殖促進等)を検出して、発現量の定量化を行う。

上述の各スクリーニング方法で使用する被験化合物としては、天然化合物、合成化合物、無機化合物、有機化合物、精製・未精製または粗精製タンパク質、ペプチドまたは非ペプチド化合物が挙げられ、さらに複数の化合物を含む化合物ライブラリー、遺伝子ライブラリーの発現産物、細胞抽出物、細胞培養上清、発光微生物産生物、海洋生物抽出物、植物抽出物、生体組織抽出物等も使用可能である。被験化合物がタンパク質やペプチドである場合には、担体と結合させたり、他のポリペプチドと融合したり、細胞膜上に発現させた膜画分として利用することもできる。これらの被験化合物は必要に応じ、放射標識、蛍光標識等により標識して用いられる。

上述の各スクリーニング方法に必要とされる細胞、発現ベクター、被験化合物、プローブ、プライマー、抗体、レポーター遺伝子発現測定用の基質等は適宜組合わせてキットとすることもできる。さらに、キットには必要に応じ細胞培養のための培地や容器、コントロールとして用いることができる試料、キットの使用説明書等も含めることができる。そして、上述の各スクリーニングにより選択された被験化合物は、直接単独で患者に対して用いる医薬とすることもできるが、必要に応じ、周知の製剤法に従って製剤化して用いることも可能である。化合物がDNA等のポリヌクレオチドである場合、または、DNAによりコード可能なポリペプチドである場合、ポリヌクレオチドを前述の遺伝子治療の方法に従って投与することも考えられる。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明についてより詳細に検討するが、本発明はこれらの実施例により何等限定されるものではない。

[実施例1] Subtractive Hybridization (SSH) による遺伝子単離

雄WKYラットのL-NAME(100mg/L)一週間経口投与群、及びL-NAME投与を行って

- 22 -

いない対照群の心臓から RNA を抽出し、サブトラクション法により L-NAME 群で発現が亢進している cDNA のクローニングに用いた。その結果、新規遺伝子 LACS (L-NAME related ActinCytoSkeletal protein) の単離に成功した。該遺伝子について、心臓組織での mRNA 発現を Northern blot 法で検討したところ、L-NAME 投与から 1 ～3 日後をピークに増加し、7 日目からは減少し、さらに、投与から 28 日後にはベース近くまで漸減した。さらに、心臓以外の組織における mRNA 発現も Northern blot 法により検討した。その結果、心臓及び骨格筋における LACS mRNA の発現が観察された。特に心臓では、LACS mRNA の発現が心筋細胞で見られることが確認された。

[実施例 2] 全長 cDNA の単離

cDNA ライブラリーを作成し、スクリーニングにより LACS をコードする全長 cDNA を単離した。具体的には、ランダムプライマーを用い、L-NAME 投与後 1 日目の WKY ラットから得た poly RNA より λ ZAPII cDNA ライブラリーを作成した。続いて LACS 遺伝子の断片をプローブとしたスクリーニングを繰り返すことにより、全長約 12kb の cDNA を LACS 遺伝子として取得した。ABI PRISM 310 DNA Sequencer (ABI/Perkin Elmer) により、該 cDNA の配列決定を行った。得られた塩基配列を配列番号: 1 に示す。該塩基配列から予測されたアミノ酸配列 (配列番号: 2) には、シグナル配列や膜貫通領域等の特徴的な配列は見られず、LACS の属性、機能を配列のみから推定することは困難であった。但し、予測アミノ酸配列の C 末側には、プロリンに富む配列が存在し、SH3 (Src キナーゼファミリーに見られる約 70 アミノ酸からなる相同性部分) が結合するドメイン (通常、10 アミノ酸程度のプロリン残基に富む配列からなる) との相同性が示された。

[実施例 3] 高血圧モデル心臓における mRNA 発現

AngII infusion rat (osmotic pump: 0.7mg/kg/day) 並びに 4 週齢及び 24 週齢の SHR の心臓組織を用いた。AT1R アンタゴニスト (ARB) 及びヒドラジン (Hyd) を降圧剤として用いた。各降圧剤は血圧を下げるのに十分とされる量で用いた (ARB, 10m

- 23 -

g/kg/day; Hyd, 12 mg/kg/day)。

その結果、AngII infusion rat では、AngII 投与から3日後にはLACSの発現が上昇し、7日後には減少するという傾向が認められた。この発現上昇の大部分はヒドラジンの同時投与によって抑制されず、ARBの同時投与によって抑制される傾向が観察された。一方SHRでは、高血圧発症前の若年齢ラットではLACS mRNAの有意な発現増加が観察されなかったのに対し、心肥大の進行する高血圧発症後の成年ラットで有意な発現増加が認められた。

以上のように複数の高血圧・心肥大のモデル動物の心臓でLACS mRNAの発現増加が認められ、高血圧を是正してもその発現は完全には抑制されなかった。これらの事実は、局所におけるRAS系の活性化によりLACS mRNAの発現が増幅される可能性を示唆するものである。そこで実施例6において、AngII刺激による細胞応答について検討した。

[実施例4] LACS タンパク質の局在

LACS に対する抗体をLACSのC末端側を用いて作成した。該ペプチド抗体を用いた細胞染色によりLACSの細胞内局在を検討した。

(1) 心臓における局在

LACS は心臓組織ではバンド状に染色され、介在板と一致しているように見えた。介在板に存在する代表的なタンパク質であるカドヘリンと二重染色し、共焦点蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、その局在がほぼ一致していたことから、LACS は介在板付近に存在すると思われる。

(2) 培養心筋細胞における局在

新生児ラット(生後1~3日目)を用い、トリプシン、コラゲナーゼを用い心筋細胞を単離し、初代培養した。最初の24~48時間は血清を含む培地中で培養を行い、その後、無血清培地で24時間培養した。

培養心筋細胞をWestern blot 法により調べたところ、LACS タンパク質は細胞骨格成分(TritonX insoluble fraction)に分画した。免疫染色では、アクチンフ

- 24 -

ファイバーに沿った染色が観察され、特に細胞間接着部位の付近が染色される。細胞間接着部位は、*in vivo* における介在板様構造であると言われており、LACS は細胞間接着部位のアクチンファイバーに沿って存在すると考えられた。

以上の結果から、LACS は細胞骨格タンパク質であることが明らかとなった。

[実施例 5] LACS 発現

LACS に c-myc tag を付加し、発現ベクターに導入した。発現ベクターとして、pcDNA3.1 (Invitrogen) 及び pEGFP (CLONTECH) を用いた。作成した発現ベクターを C OS-1 細胞に FuGene6 (Roche Diagnostics) を用いて遺伝子導入し、一過性に過剰発現させた。48 時間後、c-myc に対する Western blot により、LACS の塩基配列から理論的に推定された分子量に相当する 374kDa 付近にバンドを検出した。また、細胞固定後に行った c-myc の免疫染色により細胞単位での c-myc 融合 LACS タンパク質の発現が確認された。

[実施例 6] 培養心筋細胞への肥大性アゴニスト刺激による LACS 発現の増加

実施例 4 と同じ方法により培養した心筋細胞を用いた。まず、代表的な肥大性アゴニストである、AngII、Phenylephrine、及び Endothelin-1 を用いて細胞を刺激した。各培養細胞について、LAC タンパク質発現を検出したところ、いずれの肥大性アゴニストを用いた場合であっても、発現が増加していることが判明した。

また、phenylephrine 刺激により増加する LACS 発現は、10 μ M Y27632 (ROCK 阻害剤; Calbiochem) の同時投与により抑制された。これは、LACS 遺伝子の発現に Rho/ROCK 系が関与していることを示唆するものである。Rho は、アクチンフィラメントの再編性を介して平滑筋の収縮や細胞質分裂、細胞運動、細胞形態の制御に関与する低分子量 GTP 結合タンパク質 (small G protein) である。

[実施例 7] アクチンの検出

LACS 抗体による免疫沈降を行い、培養心筋細胞より沈降タンパク質を得た。得られたタンパク質について Western blot により、アクチンタンパク質のバンド (抗アクチン抗体により) を検出することができた。

- 25 -

この結果は、LACS とアクチンが結合していることを示すものである。実施例 4 の免疫染色でのカドヘリンとの局在と一致から、LACS とカドヘリンが相互作用している可能性も考えられたが、上記実験ではカドヘリンに対応するバンドは検出されず、直接カドヘリンと結合している可能性は否定された。

[実施例 8] 頸動脈における LACS 発現

RT-PCR による LACS mRNA の発現分析により、頸動脈にその発現が認められた。バルーン傷害後、mRNA 発現は徐々に増加し、7 日後にピークに達した。これは、平滑筋に LACS が存在する可能性を示唆するものである。平滑筋は培養が容易であり、また安定であることから LACS のさらなる機能解析を行うのに好都合である。

産業上の利用の可能性

本発明により、アクチン関連新規細胞骨格タンパク質 LACS 及び該タンパク質をコードする遺伝子が提供された。LACS タンパク質は複数の高血圧・心肥大のモデル動物の心臓で発現が増加していること、肥大性アゴニスト投与により発現が増大すること、及び、細胞内においてアクチンと結合していることが本発明により明らかにされた。これらの事実は、LACS タンパク質がアクチン重合の促進または抑制により、心血管系の維持において一定の役割を果たしていることを示唆するものである。従って、本発明のタンパク質及び該タンパク質をコードするポリヌクレオチドは、アクチン重合の関与する心不全、心肥大、心筋炎、心筋症、動脈硬化、閉塞性動脈硬化症、虚血性心疾患等の心疾患の予防、改善、または治療に有効であると考えられる。

- 26 -

請求の範囲

1. 以下の(a)～(d)より選択されるタンパク質。
 - (a) 配列番号: 1 記載のアミノ酸配列を含むタンパク質
 - (b) 配列番号: 1 記載のアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換、付加及び/または挿入により改変されたアミノ酸配列を含むタンパク質
 - (c) 配列番号: 2 記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを含むタンパク質
 - (d) 配列番号: 1 記載のアミノ酸配列と、60%の相同性を有するアミノ酸配列を含むタンパク質
2. 請求項1記載のタンパク質、またはその一部をコードするポリヌクレオチド。
3. 配列番号: 2 記載の塩基配列を含む、請求項2記載のポリヌクレオチド。
4. 請求項1記載のタンパク質を含む医薬。
5. 心不全、心肥大、心筋炎、心筋症、動脈硬化、閉塞性動脈硬化症、または虚血性心疾患の予防、改善、または治療に用いられる請求項4記載の医薬。
6. 請求項2記載のポリヌクレオチドを含む医薬。
7. 心不全、心肥大、心筋炎、心筋症、動脈硬化、閉塞性動脈硬化症、または虚血性心疾患の予防、改善、または治療に用いられる請求項6記載の医薬。

1 / 33

10/526109
BT01 Rec'd PCT/PTC 28 FEB 2005

SEQUENCE LISTING

<110> ANGES MG, INC.

<120> Novel actin-related sytoskeletal protein LACS

<130> MED-X0206P

<140>

<141>

<150> JP 2002-255442

<151> 2002-08-30

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3302

<212> PRT

<213> Rattus rattus

<400> 1

Met Ala Arg Tyr Gln Ala Ala Val Ser Arg Gly Asp Thr Arg Ser Phe

1

5

10

15

2 / 3 3

Ser Ala Asn Val Met Glu Glu Ser Asp Leu Ser Thr Val Pro Gly Gly

20

25

30

Leu Ala Lys Met Lys Arg Gln Phe Glu Lys Asp Glu Met Thr Ser Thr

35

40

45

Cys Asn Ala Phe Ser Glu Tyr Gln Tyr Gln His Glu Ser Arg Ser Glu

50

55

60

Gln Glu Ala Ile His Asn Arg Gln Glu Ile Arg Arg Asn Glu Glu Glu

65

70

75

80

Val Ser Lys Gly His Arg Thr Asp Val Phe Lys Ala Glu Met Met Ser

85

90

95

His Leu Glu Lys His Thr Glu Glu Thr Asn Gln Ala Ser Gln Phe Arg

100

105

110

Gln Tyr Val Gln Glu Thr Val Ile Asp Thr Pro Glu Asp Glu Glu Ile

115

120

125

Pro Lys Val Ser Thr Lys Ile Leu Lys Glu Gln Phe Glu Lys Thr Ala

130

135

140

Gln Glu Asn Phe Leu Tyr Ser Asp Lys Glu Thr Thr Thr Pro Ala Lys

3 / 3 3

145 150 155 160

Cys Ile Lys Ile Glu Asn Asp Ser Glu Glu Thr Leu Lys Pro Ser Ser

165 170 175

Ala Met Gly Thr Ser Ser Tyr Thr Ser Ala Arg Gln Ser Lys Glu Thr

180 185 190

Ser Thr Ser Ser Tyr Ser Asn His Ser Leu Thr Ser Thr Ile Leu Ala

195 200 205

Gln Glu Lys Gly Thr Pro Ser Gly Lys Met Glu Glu Phe Pro Pro Pro

210 215 220

Pro Pro Asp Val Phe Gln Thr Pro Met Asp Val Thr Ala Phe Ser Gln

225 230 235 240

Ser Pro Glu Phe Pro Ser Pro Pro Arg Arg Leu Pro Met Pro Arg Asp

245 250 255

Val Tyr Ser Lys Gln Arg Asn Leu Tyr Glu Leu Asn Arg Leu Tyr Arg

260 265 270

His Ile His Pro Glu Leu Arg Lys Asn Leu Glu Lys Asp Tyr Ile Ser

275 280 285

4 / 3 3

Glu Val Ser Glu Ile Val Ser Ser His Ile Asn Ser Gly Asn Ser Ile

290

295

300

Ser Ala Gly Val Gln Gln Ala Arg Tyr Val Phe Glu Asn Thr Asn Asp

305

310

315

320

Ser Ser Gln Lys Asp Leu Ser Ser Glu Arg Glu Asn Leu Glu Trp Asp

325

330

335

Glu Ile Leu Lys Gly Glu Val Gln Ser Ile Arg Trp Ile Phe Glu Asn

340

345

350

Gln Pro Leu Asp Ser Ile Asn Gln Gly Phe Thr Asp Glu Ala Tyr Thr

355

360

365

Ser Lys Gly Ile Ala Asp Gln Glu Leu Ile Ala Gly Gly Asp Val Lys

370

375

380

Tyr Thr Thr Trp Met Phe Glu Thr Gln Pro Ile Asp Ala Leu Gly Val

385

390

395

400

Pro Ser Ala Gly Thr Glu Glu Asn Thr Glu Lys Ile Pro Glu Leu Ala

405

410

415

Lys Gly Asp Val Cys Thr Ala Arg Trp Met Phe Glu Thr Arg Pro Leu

420

425

430

5 / 3 3

Asp Ser Met Asn Lys Met His Glu Trp Glu Asp Glu Thr Ala Ser Thr

435

440

445

Phe Ile Lys Asp Ile Thr Gly Gly Asp Val Lys Thr Val Arg Tyr Met

450

455

460

Phe Glu Thr Gln Gln Leu Asp Gln Leu Gly Gln Leu His Ser Val Asp

465

470

475

480

Glu Met Asn Leu Leu Gln Leu Arg Ser Glu Leu Lys Glu Ile Lys Gly

485

490

495

Asn Val Lys Arg Ser Ile Lys Cys Phe Glu Thr Gln Pro Leu Tyr Val

500

505

510

Ile Arg Asp Gly Ser Gly Gln Met Leu Glu Ile Lys Thr Val Gln Arg

515

520

525

Glu Asp Ile Glu Lys Gly Asp Val Arg Thr Ala Arg Trp Met Phe Glu

530

535

540

Thr Gln Pro Leu Asp Thr Ile Lys Gln Asp Ile Thr Glu Ile Lys Val

545

550

555

560

Val Arg Gly Ile Ser Met Glu Glu Asn Val Lys Gly Glu Val Gly Arg

6 / 3 3

565

570

575

Ala Arg Trp Leu Phe Glu Thr Gln Pro Leu Glu Lys Ile Lys Glu Glu

580

585

590

Ser Gly Glu Ala Val Leu Lys Thr Glu Ala Val Val Gly Ile Asp Val

595

600

605

Ser Lys Lys Cys Trp Met Phe Glu Thr Gln Pro Leu Asp Thr Leu Lys

610

615

620

Gln Ser Pro Asp Thr Glu Ser Val Ser Pro Glu Glu Arg Ile Gly Gly

625

630

635

640

Asp Val Lys Thr Thr Lys His Leu Leu Glu Thr Leu Pro Ile Glu Ala

645

650

655

Leu Lys Asp Ser Pro Asp Val Gly Lys Leu Gln Lys Ile Thr Ala Ser

660

665

670

Glu Glu Glu Lys Gly Asp Val Lys His Gln Lys Trp Val Phe Glu Thr

675

680

685

Gln Arg Leu Glu Asp Ile Arg Glu Asp Lys Lys Glu Tyr Thr Gln Thr

690

695

700

7 / 3 3

Val Lys Leu Glu Ala Val Asp Arg Gly His Val Lys Asn Glu Thr His

705 710 715 720

Ile Phe Glu Ser Asn Asn Leu Ile Lys Val Asp Ala Ser His Gln Ile

725 730 735

Glu Val Glu Gly Val Thr Arg Gly Thr Val Glu Leu Asn Lys Ser Leu

740 745 750

Phe Glu Thr Thr Pro Leu Tyr Ala Ile Gln Asp His Leu Gly Lys Tyr

755 760 765

His Gln Val Lys Thr Val Gln Gln Glu Glu Ile Val Arg Gly Asp Val

770 775 780

Arg Ser Cys Arg Trp Leu Phe Glu Thr Arg Pro Ile Asp Gln Phe Asp

785 790 795 800

Glu Ser Leu His Lys Phe Gln Ile Ile Arg Gly Ile Ser Ala Gln Glu

805 810 815

Ile Gln Ala Gly Asn Val Lys Ser Ala Arg Trp Leu Phe Glu Thr Gln

820 825 830

Pro Leu Asp Ser Ile Lys Tyr Phe Ser Asn Val Glu Glu Thr Asp Ser

835 840 845

8 / 3 3

Lys Thr Glu Gln Ser Thr Asp Ile Val Lys Gly Asp Val Lys Thr Cys

850

855

860

Lys Trp Leu Phe Glu Thr Gln Pro Met Glu Ser Leu Tyr Glu Lys Ala

865

870

875

880

Ser Leu Met Thr Asn Ser Glu Asp Ile His Lys Gly Asp Val Arg Thr

885

890

895

Cys Met Trp Leu Phe Glu Thr Gln Pro Leu Asp Ala Ile Lys Asn Asp

900

905

910

Ser Glu Ala Thr Val Lys Leu Gln Thr Val Lys Gln Glu Glu Ile Gln

915

920

925

Gly Gly Asp Val Arg Thr Ala Cys Leu Leu Phe Glu Thr Glu Asn Leu

930

935

940

Asp Asn Ile Gln Gly Gly Glu Gly Lys Glu Thr Lys Pro Val Glu Met

945

950

955

960

Asp Ile Glu Ser Gly Asp Val Ser Gly Met Lys Tyr Lys Phe Glu Asn

965

970

975

Gln Ser Leu Asp Ser Ile Ser Cys Ser Ser Glu Asn Val Leu Asn Lys

9 / 3 3

980

985

990

Ile Lys Thr Leu Lys Ile Glu Asp Ile Gln Lys Gly Asn Val Leu Asn

995

1000

1005

Cys Arg Trp Leu Phe Glu Asn Gln Pro Ile Asp Met Ile Lys Glu Asn

1010

1015

1020

Gln Glu Gly Asp Gly Leu Val Lys Thr Val Thr Asp Ile Gln Gly Gly

1025

1030

1035

1040

Asp Val Arg Lys Gly Cys Phe Ile Phe Glu Thr Phe Ser Leu Asp Glu

1045

1050

1055

Ile Lys Asp Glu Ser Asp Val Ile Ser Thr Arg Gln Thr Asn Thr Glu

1060

1065

1070

Glu Val Ile Lys Gly Asp Val Lys Ser Tyr Lys Met Leu Phe Glu Thr

1075

1080

1085

Gln Pro Leu Tyr Ala Ile Gln Asp Gln Glu Gly Phe Tyr His Glu Val

1090

1095

1100

Thr Thr Val Lys Lys Glu Glu Thr Ile His Gly Asp Val Arg Gly Thr

1105

1110

1115

1120

10 / 33

Arg Trp Leu Phe Glu Thr Lys Pro Leu Asp Ser Ile Asn Ala Ser Glu

1125

1130

1135

Asp Val Tyr Ile Ile Lys Ser Val Thr Gln Glu Asp Ile Gln Lys Gly

1140

1145

1150

Asp Val Ser Ser Val Arg Tyr Arg Phe Glu Thr Gln Pro Leu Asp Met

1155

1160

1165

Ile Ser Asp Lys Ser His Asn Ile Met Pro Thr Ile Asp His Ile Gln

1170

1175

1180

Gly Gly Asn Val Gln Met Asn Lys Gln Leu Phe Glu Ser Glu Gly Gly

1185

1190

1195

1200

Asp Lys Lys Asn Tyr Val Arg Thr Val Ser Ile Asn Glu Ile Gln Lys

1205

1210

1215

Gly Asn Val Lys Thr Ser Thr Trp Leu Phe Glu Thr His Ser Ile Asp

1220

1225

1230

Glu Leu Gly Glu Val Ser Thr Tyr Glu Asn Ile Lys Thr Val Thr Gln

1235

1240

1245

Glu Asp Val Gln Lys Gly Asp Val Lys Gln Ala Val Trp Leu Phe Glu

1250

1255

1260

11/33

Asn Gln Thr Leu Asp Ser Ile Lys Glu Leu Asp Glu Ser Asp Thr Lys

1265 1270 1275 1280

Ile Thr Lys Glu Glu Ile Pro Pro Ser Asp Val Lys Thr Thr Thr Trp

1285 1290 1295

Leu Phe Glu Thr Thr Pro Ile His Glu Phe Asn Glu Thr Arg Ile Glu

1300 1305 1310

Lys Glu Glu Ile Ile Gly Lys Ser Ile Lys Glu Thr Leu Glu Asp Leu

1315 1320 1325

Tyr Ser Gln Arg Val Val Glu Ala Pro Gly Ile Ile Ile Glu Ala Asp

1330 1335 1340

Glu Val Gly Asp Val Arg Met Ala Lys Tyr Lys Leu Met Asn Gln Arg

1345 1350 1355 1360

Thr Pro Glu Ile Gln Lys Glu Glu Val Ile Arg Ala Asp Leu Gly Asn

1365 1370 1375

Ile Met Met Asn Leu Leu Ser Gln Arg Asp Cys Thr Lys Lys Glu Ile

1380 1385 1390

Phe Ile Ser Glu Glu Glu Lys Gly Asn Val Asn Phe Thr Lys Thr Gln

1 2 / 3 3

1395

1400

1405

Leu Leu Asn Arg Ser Met Glu Phe His Ala Glu Lys Glu Glu Ile Val

1410

1415

1420

Arg Gly Asp Val Lys Gln Ala Ile Gln Lys Leu Phe Ser Glu Glu Arg

1425

1430

1435

1440

Cys Ala Lys Arg Gly Ile Leu Ile Gln Glu Asp Glu Lys Gly Asp Val

1445

1450

1455

Asn Met Thr Ile Tyr Cys Leu Leu His Glu Asn Ala Gly Asp Lys Thr

1460

1465

1470

Lys Arg Glu Asp Ile Leu Gly Gly Asp Val Arg Arg Thr Ile His Asn

1475

1480

1485

Leu Leu Ser Ser Ala Ser Asn Asp Lys Ile Ser Glu Arg Thr Lys Ile

1490

1495

1500

Asp Ala Ser Glu Arg Gly Asn Val Gln Phe Phe Thr Thr Cys Ile Glu

1505

1510

1515

1520

Thr Gly Ala Leu Asp Tyr Leu Lys Gln Leu Gln Thr Gly Ser Asn Glu

1525

1530

1535

1 3 / 3 3

Thr Leu Thr Ala Arg Lys Gln Glu Gly Glu Glu Glu Ile Ile Gly Gly

1540

1545

1550

Asp Val Glu Gly Thr Lys Phe Leu Leu Lys Lys Arg Gln Ser Ser Ile

1555

1560

1565

Glu Arg Thr Val Ser Glu Thr Asp Ile Ile Pro Gly Asp Val Arg Asn

1570

1575

1580

Thr Val Lys Val Phe Met Thr Glu Pro Gln Ser Ala Ser Phe Lys Thr

1585

1590

1595

1600

Ala Lys Glu Glu Ile Val Lys Gly Asp Leu Lys Ser Thr Leu Asn Ser

1605

1610

1615

Leu Asn Gln Ala Met Asn Gln Lys Val Val Ala Lys Thr Glu Asp Ile

1620

1625

1630

Met Lys Asp Asp Lys Ala Ala Ile Leu Lys Ser Leu Lys Glu Ser Gly

1635

1640

1645

Gly Arg Gln Lys Glu His Lys Gln Ser Ala Ser Ile Ser Ser Asp Ile

1650

1655

1660

Gly Gln Ala Ile Glu Cys Leu Glu Lys Ala Thr Asn Thr Arg Thr Glu

1665

1670

1675

1680

14 / 33

Ile Leu Lys Lys Glu Leu Ile Leu Asp Asp Leu Lys Thr Ser Leu Arg

1685

1690

1695

Ser Leu Lys Glu Glu Gln Tyr Ser Phe Lys Glu Val Gly Lys Gln Gly

1700

1705

1710

Met Val Lys Asp Val Leu Gly Phe Ser Glu Arg Gln Glu Leu Gly Ile

1715

1720

1725

His Pro Ala Ala Val Gln Arg Glu Lys Lys Ser Leu Leu Gln Pro Val

1730

1735

1740

Pro Gly Pro Cys Glu Pro Ala Ile Arg Gln Gln Ala Gly Pro Gly Pro

1745

1750

1755

1760

Leu Asp Glu Ala Thr Gln Lys Ser Cys His Arg Ser Leu Thr Glu Glu

1765

1770

1775

Arg Thr Glu Ala Asn Leu Pro Lys Ala Pro Lys Gly Thr Val Lys Ile

1780

1785

1790

Val Ile Asp Arg Glu Gln Asn Asn Asp Ala Leu Glu Lys Ser Leu Arg

1795

1800

1805

Lys Met Ser Asn Ser Glu His Arg Ala Met Lys Asn Val Leu Asp Met

1 5 / 3 3

1810

1815

1820

Gly Asp Arg Arg Gly Val Trp Thr Glu Ser Lys Glu Cys Leu Cys Ser

1825

1830

1835

1840

Asp Asp His Met Ser Lys Tyr Val Ser Ala Ser Met Ser Arg Lys Lys

1845

1850

1855

Ser Leu Lys Thr Lys Glu Ser Glu Asn Val Arg Glu Ser Lys Asp Asp

1860

1865

1870

Val Ser Ser Thr Gln Ser Val Asp Lys Thr Phe Arg Lys Gln Gln Thr

1875

1880

1885

Gln Asn Cys Glu Leu Gly Lys Asp His Gln Lys Ser Gln Phe Gln Asp

1890

1895

1900

Ser Tyr Ala Lys Asn Gln Lys Asn Thr Gln Asn Ile Ser Met Ser Ala

1905

1910

1915

1920

Glu Thr Gln Ser Tyr Arg Pro Asp Pro Thr Gln His Pro Val Ser Asn

1925

1930

1935

Pro Ala Gly Glu Thr Leu Glu Met Thr Arg Asp Phe Gln Lys Gln Ala

1940

1945

1950

16 / 33

Leu Ile Arg Gln Glu Lys Gln Asn Ser Asn Lys Asp Met Arg Lys Asn

1955

1960

1965

Asp Met Gly Leu Gln Pro Leu Pro Val Gly Lys Asp Ala His Ser Ala

1970

1975

1980

Pro Gly Val Thr Val Ser Gly Lys Asn His Lys Arg Thr Gln Ala Pro

1985

1990

1995

2000

Asp Lys Lys Gln Arg Ile Asp Val Cys Leu Glu Ser Gln Asp Phe Leu

2005

2010

2015

Met Lys Thr Asn Thr Ser Lys Glu Leu Lys Met Ala Met Glu Arg Ser

2020

2025

2030

Phe Asn Pro Val Asn Leu Tyr Pro Asp Cys Gly Val Lys Glu Asn Glu

2035

2040

2045

Asp Ala Leu Pro Pro Pro Ser Pro Pro Pro Pro Pro Pro Ser Asn Ala

2050

2055

2060

Ser Ser Glu Ile Glu Phe Pro Leu Pro Pro Pro Pro Pro Ile Met Leu

2065

2070

2075

2080

Leu Pro Glu Lys Asn Glu Phe Pro Pro Ser Ser Pro Thr Glu Lys Ser

2085

2090

2095

17/33

Arg Ala Glu Leu Glu Ser Leu Pro Thr Leu Pro Leu Pro Pro Pro Pro

2100

2105

2110

Gly Asp Glu Lys Ser Asp Gln Glu Cys Leu Pro Thr Ser Leu Pro Pro

2115

2120

2125

Pro Pro Pro Thr Ala Pro Ser Gln Pro Ala His Leu Leu Ser Ser Ser

2130

2135

2140

Val Leu Glu His His Ser Glu Ala Phe Leu Gln Gln Tyr Ser Arg Lys

2145

2150

2155

2160

Glu Thr Leu Asp Ser His Gln Leu His Ser Gln Ala Lys Ile Leu Thr

2165

2170

2175

Gly Lys Ser Pro Pro Pro Thr Leu Pro Lys Pro Lys Leu Pro Glu Arg

2180

2185

2190

Ile Lys Ala Lys Met Ser Gln Asp Ser Pro Ser Gly Glu Leu Glu Arg

2195

2200

2205

Ser Leu Ser Asp Val Glu Ile Lys Thr Thr Leu Ser Lys Asp Gln Lys

2210

2215

2220

Ser Ser Leu Val Ala Glu Ser Arg Glu His Thr Glu Ala Lys Gln Glu

18 / 33

2225 2230 2235 2240

Val Phe Arg Lys Ser Leu Gly Arg Lys Gln Leu Ser Ile Ser Ser Ala

2245 2250 2255

Asn Ser Leu Ser Gln Thr Val Pro Glu Ile Pro Ala Pro Lys Glu Lys

2260 2265 2270

Gln Thr Ala Pro Leu Val Lys Ser His Ser Phe Pro Ser Gly Ser Glu

2275 2280 2285

Gln Gln Ser Pro Lys Pro Tyr Met Arg Lys Phe Lys Thr Pro Leu Met

2290 2295 2300

Ile Ala Glu Glu Lys Tyr Arg Gln Gln Arg Glu Glu Leu Glu Lys Gln

2305 2310 2315 2320

Arg Arg Glu Ser Ser Cys His Ser Ile Ile Lys Thr Glu Thr Gln His

2325 2330 2335

Arg Ser Leu Ser Glu Lys Glu Lys Glu Thr Glu Leu Gln Lys Ala Ala

2340 2345 2350

Glu Ala Met Ser Thr Pro Arg Lys Asp Ser Asp Phe Thr Arg Ala Gln

2355 2360 2365

19 / 33

Pro Asn Leu Glu Pro Lys Ser Lys Ala Val Ile Ala Ser Glu Cys Ser

2370

2375

2380

Glu Ser Gln Leu Ser Thr Ala Ser Ala Leu Thr Val Ala Thr Glu Arg

2385

2390

2395

2400

Leu Gln His Val Leu Ala Ala Ser Asp Asp Lys Leu Thr Leu Arg Arg

2405

2410

2415

Glu Gly Thr Gln Asn Ser Ser Asp Thr Leu Gln Ser Lys Thr Ala Cys

2420

2425

2430

Glu Ile Asn Gln Ser His Lys Glu Cys Arg Thr Glu Gln Thr Phe Glu

2435

2440

2445

Gln His Val Glu Lys Leu Pro Phe Pro Gln Thr Lys Pro Ile Ser Pro

2450

2455

2460

Ser Phe Lys Val Lys Thr Ile Arg Leu Pro Ala Leu Asp His Thr Leu

2465

2470

2475

2480

Thr Glu Thr Asp Leu Ser Ser Glu Arg Arg Val Lys Gln Ser Glu Ile

2485

2490

2495

Asp Val Gln Thr Ser Thr Lys Glu Met Asn Lys Glu Ile Lys Lys Thr

2500

2505

2510

20 / 33

Glu Val Ser Thr Gln Cys Asp Asn Lys Gln Ser Val Ala Glu Lys Tyr

2515

2520

2525

Phe Gln Leu Pro Lys Thr Glu Lys Arg Val Thr Val Gln Met Pro Lys

2530

2535

2540

Asp Tyr Ala Ala Lys Ser His Gln Ser Lys Leu Gln Thr Val Pro Lys

2545

2550

2555

2560

Lys His Gly Gly Leu Gly Glu Phe Asp Arg Gly Asn Val Leu Gly Arg

2565

2570

2575

Glu Gly Lys Asn Gln Asp Ser Ser Met Ser Ser Thr Lys Glu Ser Arg

2580

2585

2590

Val Ile Val Glu Arg Lys Gln Glu His Leu Gln Asp Gln Ser Val Pro

2595

2600

2605

Arg Leu Val Gln Gln Lys Ile Ile Gly Glu Ser Leu Asp Ser Arg Val

2610

2615

2620

Gln Asn Phe Gln Gln Thr Gln Thr Gln Thr Ser Arg Ile Glu His Lys

2625

2630

2635

2640

Glu Leu Ser Gln Pro Tyr Ser Glu Lys Lys Cys Leu Arg Asp Lys Asp

2 1 / 3 3

2645

2650

2655

Lys Gln Gln Lys Gln Val Ser Ser Asn Thr Asp Asp Ser Lys Gln Glu

2660

2665

2670

Ile Thr Gln Lys Gln Ser Ser Phe Ser Ser Val Arg Glu Ser Gln Gln

2675

2680

2685

Asp Gly Glu Lys Cys Ala Ile Asn Ile Leu Glu Phe Leu Arg Lys Arg

2690

2695

2700

Glu Glu Leu Gln Gln Ile Leu Ser Arg Val Lys Gln Phe Glu Ala Asp

2705

2710

2715

2720

Ser Asn Lys Ser Gly Leu Lys Thr Phe Gln Thr Leu Leu Asn Ile Ala

2725

2730

2735

Pro Val Trp Leu Ile Ser Glu Glu Lys Arg Glu Tyr Gly Val Arg Val

2740

2745

2750

Ala Met Glu Asn Asn Leu Glu Lys Val Lys Glu Glu Ile Ile His Ile

2755

2760

2765

Lys Thr Gln Ala Glu Glu Met Leu Val His Cys Glu His Val Ile Arg

2770

2775

2780

2 2 / 3 3

Thr Ala Met Met Ala Ser Gln Thr Gly Lys Gln Lys Asp Lys Pro Thr

2785 2790 2795 2800

Asn Leu Asn Glu Met Pro Leu Lys Val Ser Asn Val Asn Leu Ser Ser

2805 2810 2815

His Lys Gly Thr Glu Gln Lys Glu Ser Lys Ile Val Glu Glu Lys Leu

2820 2825 2830

Ala Ser Arg Gln Val Ala Thr His Ser Glu Ala Ala Thr His Asn Pro

2835 2840 2845

Ala Lys Thr Tyr Gln Glu Ala Lys Gly Asp Asp Ser Lys Met Ala Pro

2850 2855 2860

Pro Ser Leu Lys Thr Arg Pro Pro Ser Pro Thr Phe Ile Thr Ile Glu

2865 2870 2875 2880

Ser Thr Ala Arg Arg Ala Glu Thr Ser Thr Lys Ser Glu Leu Ser Gln

2885 2890 2895

Ser Pro Lys Asn Asn Ser Cys Val Glu Pro Leu Pro Arg Arg Pro Met

2900 2905 2910

Glu His Thr Ser Arg Leu Pro Arg Thr Ser Thr Ser Pro Ser Pro Pro

2915 2920 2925

23 / 33

Arg Ser Arg Ser Glu Gln Leu Val Arg Leu Lys Asp Thr Thr Ala Arg

2930

2935

2940

Leu Ala Lys Gly Thr Ile Pro Cys Ser Pro Gly Thr Pro Val Pro Val

2945

2950

2955

2960

Val Glu Lys Arg Ser Glu Val Val Met Ser Pro Ala Thr Leu Arg Arg

2965

2970

2975

Gln Ile Lys Ile Glu Ser Arg Gly Gly Asp Ser Pro Pro Thr Ile Thr

2980

2985

2990

Ile Pro Val Ser Val Asn His His Val Val Ser Gly Ser Phe Arg Glu

2995

3000

3005

Ser Val Asp Ala Gln Glu Ala Val Lys Lys Thr Glu Lys Thr Glu Thr

3010

3015

3020

Tyr Val His Lys Asp Lys Lys Asn Ser Val Ser Ser Ala Met Pro Glu

3025

3030

3035

3040

Thr Glu Ser Tyr Asp Ala Val Glu Ile Ile Arg Lys Val Glu Gly Pro

3045

3050

3055

His Leu Ser Glu His Arg Glu Arg Phe Glu Ala Thr Asn Gln Thr Val

2 4 / 3 3

3060

3065

3070

Gln Met Ala Glu His Phe Leu Asn Gly His Glu Asn Glu Val Asn Arg

3075

3080

3085

Trp Phe Arg Glu Phe Glu Asn Gly Pro Val Phe Gly Ala Lys Thr Glu

3090

3095

3100

Arg Arg Ala Tyr Ala Asn Gly Glu Ile Asn His Asn Met Lys Gln Glu

3105

3110

3115

3120

Ser His Thr Phe Cys Lys Glu Glu Phe Gly Leu Glu Ser Ser Glu Thr

3125

3130

3135

Ala Asn Phe Thr Gly Phe Ser Tyr Arg His Pro Arg Glu His Arg Ala

3140

3145

3150

Lys Ala Pro Ala Thr Gln Pro Arg Val His Ser Glu Ala Arg Ala Leu

3155

3160

3165

Asn Glu His Phe Leu Ser Val Asp Ala Phe Asp Ser Gln Ile Val Glu

3170

3175

3180

Ser Gln Val Ala Thr Ser Ser Ser Arg Ser Ser Glu Ala Gly Arg Ser

3185

3190

3195

3200

25 / 33

Gly Phe Asp Phe Lys His Ala Pro Pro Thr Tyr Glu Asp Val Ile Ala

3205

3210

3215

Gly His Ile Leu Asp Ile Ala Asp Ser Pro Thr Asn Leu Arg Arg Asn

3220

3225

3230

Phe Gln Lys Thr Trp Gln Glu Ser Glu Arg Val Phe Lys Ser Val Gly

3235

3240

3245

Tyr Glu Thr Ser Asp Ala His Ala Thr Glu Met Ser Arg Ala Phe Gln

3250

3255

3260

Glu Glu Leu Ala Phe Leu Ser Glu Thr Val Gly Pro Arg Gln Gly Asn

3265

3270

3275

3280

Leu His Asn Leu Ser Lys Asp Gly Leu Ser Asn Gly Val Pro Arg Ser

3285

3290

3295

Arg Pro Ala Glu Phe Ser

3300

<210> 2

<211> 12178

<212> DNA

<213> Rattus rattus

26 / 33

<400> 2

agctgggtctc cactctgctg gttgctttca ggggactggg aaatttgctg tatctcaaac 60
aggaggagAAC cttccgagtg aagagttgca aatccataga gcattttctac ggagataggg 120
tcaattcttg tacaagaga ctttcaacct tactaagccg ggagacgtga gtactgctgg 180
gactgaggac cagtcggatc tcctagaggc gctgtccctg aaggagagga tggctaggta 240
ccaggcagct gtttcacggg gcgacacccg cagctttctcg gctaattgtca tggaagaatc 300
agacttgctgc accgtgcctg gtggtttagc caagatgaag agacaatttg aaaaggatga 360
aatgacttca acctgcaatg ctttctctga gtatcaatac caacatgaga gcagatctga 420
gcaggaggca atccacaaca ggcaagaaat aagaaggaat gaagaagaag tttctaaagg 480
acacagaact gatgtcttca aagctgaaat gatgtcacat cttgaaaagc acacggagga 540
aacaaccaa gcttcacagt ttctgtaata tgttcaagaa acagtcattg atacaccaga 600
agacgaagag atttctaagg ttccactaa gattttaaaa gagcaatttg aaaagactgc 660
ccaggaaaac ttctctact ctgataaaga aacaacaacc ccagccaagt gtataaagat 720
tgaaaatgac agtgaagaaa ctttaaagcc atcatcggct atgggtacct cttcttatac 780
ttcagccagg caaagcaagg aaacttcaac ctcaagttat agtaatcaca gtctgacttc 840
aacaatcctg gcacaagaaa agggcactcc ttcaggaaag atggaagaat ttctcctcc 900
cccacctgat gtttttcaaa caccaatgga tgtgacagca ttttccagc cccctgaatt 960
ccccagccct cctagaagac tgccaatgcc cagagatgta tattccaagc aacgaaattt 1020
gtatgaatta aaccgtttat ataggcatat ccctcctgag ttaagaaaaa acttagaaaa 1080
agattatata agtgagggtt ctgaaattgt ttctagtcac ataaactcag ggaactcgat 1140
atcagcaggt gtacaacaag ctcggtatgt tttcgaaaat acgaatgaca gttctcagaa 1200
agatttgagc tcagaaagag aaaacctgga gtgggatgaa attctgaaag gagaggtgca 1260
gtcaattcga tggatttttg agaatcagcc attagattct atcaaccaag gttttacaga 1320
tgaagcgtac acttccaaag gcattgctga ccaagaactc attgctgggg gtgacgtgaa 1380
atatacgact tggatgtttg aaactcagcc aatagatgca ttgggagttc cttctgctgg 1440

27 / 33

cactgaagaa aacactgaga aaattcctga gctagctaaa ggagatgttt gcacagcaag 1500
gtggatgttt gaaacaaggc ctttagactc aatgaacaaa atgcatgaat gggaagatga 1560
aacggcatct acttttataa aggacataac tgggggagat gtcaagactg tgagatacat 1620
gtttgaaact caacaactgg atcaacttgg acagcttcac tcagtggatg aaatgaactt 1680
attacaactc agatcagagc tcaaagaaat taaaggaaat gttaagagaa gcataaaatg 1740
tttcgaaact caaccactgt atgtcattag agatggttca ggccaaatgc tagaaattaa 1800
aactgtgcag agagaagaca ttgaaaaggg agatgtaagg acagcacgct ggatgtttga 1860
aacgcagcct ttggacacaa taaaacaaga catcacggaa attaaagttg ttcgaggaat 1920
atccatggag gaaaatgtca aaggcgaggt gggtagagca aggtggttat ttgaaactca 1980
accactggag aaaatcaaag aagagtcagg tgaggctgtc ctgaaaacag aagcagttgt 2040
agggatagat gtgtctaaaa agtgttggat gtttgaaacg cagccattag acactctaaa 2100
acaatctcct gatacagaga gtgtatcacc tgaagagagg ataggaggtg acgtaaaaac 2160
caccaaacat ctgttagaaa cactcccaat agaggcctta aaagacagcc cagatgttgg 2220
aaagcttcaa aaaatcactg cctctgagga agaaaagggc gatgttaagc accaaaaatg 2280
ggtttttgaa actcaacgtt tagaagatat tagagaagat aagaaggaat ataccagac 2340
agtgaagcta gaagcagtgg acagagggca tgtgaagaac tatacacata tcttcgaatc 2400
caataatcta attaaggttg atgcatcaca tcaaattgag gtggaaggag tcacaagagg 2460
cactgtggag ttgaataaat ctctctttga gacaaccca ctgtatgcca ttcaagacca 2520
tcttgaaaaa taccaccaag taaagacagt ccagcaagaa gaaatagtaa ggggtgatgt 2580
aagaagctgt agatggcttt ttgaaacaag gccattgac caatttgacg aaagccttca 2640
taaatttcag ataattagag gaatatctgc tcaagaaata caggcaggga atgtgaaatc 2700
agctaggtgg ctgtttgaga cccaacctct tgattcaatt aaatatttta gcaacgtgga 2760
agaaacagac agcaaaactg aacagagtac tgatattggt aagggggatg tcaaaacctg 2820
taaattggcta ttgaaaccc agccaatgga gtctctttat gaaaaagctt ccttgatgac 2880
gaactcagaa gatattcaca aaggtgatgt tagaacttgt atgtggctat ttgaaactca 2940
gccacttgat gccataaaaa atgactctga agccacagta aaactgcaaa ctgtgaaaca 3000

28 / 33

ggaggagata caaggtgggg atgtccggac agcatgtctt ctttttgaga cagaaaatct 3060
ggacaacata cagggcggtg aagggaaaga aacgaagccc gtggagatgg atatagaatc 3120
tggggatgtc tctggcatga agtataagtt tgaaaatcag tccttagact ctataagttg 3180
cagttcggag aatgttttga ataagatcaa aaccctaaaa atcgaagaca ttcagaaagg 3240
caatgtttta aattgtaggt ggctatttga aaatcaacct atcgatatga taaaagaaaa 3300
tcaagaaggt gatggattgg ttaagacagt gacagacata cagggtggag atgtgagaaa 3360
gggatgcttc atttttgaga cgttttcttt agatgagatt aaagatgcct ctgatgtcat 3420
cagcaccaga caaacaata ccgaggaagt aataaaaggt gatgtaaaaa gctacaagat 3480
gctttttgaa acacaaccac tctatgcgat tcaagaccaa gaagggtttt atcatgaagt 3540
gacaacagtt aaaaaagaag aaactattca tggagatgta cgaggaacaa ggtggctctt 3600
tgaaacaaaa ccgtagact caattaacgc atcagaagat gtatacatta ttaaactctgt 3660
cactcaggaa gacattcaga agggggatgt gaggttctgc agataccgat ttgaaacaca 3720
accactggat atgatttcag acaaatcaca taatattatg ccactattg accatattca 3780
aggaggcaat gtgcagatga ataaacaact attcgagtct gaagggtggg acaagaagaa 3840
ttatgtaaga acagtgagca tcaatgaaat acaaaagggc aatgttaaga cttctacttg 3900
gctctttgaa actcacagca tagatgagct gggagaagtg tccacctatg aaaatatcaa 3960
gacagtcacc caggaagacg tgcagaaagg tgacgtgaag aaaatatcaa ggctttttga 4020
aaatcagaca ttggattcca ttaaggaact tgatgaaagt gacacaaaa taaccaaaga 4080
agaaattcct ccgtcagatg tcaagacaac aacgtggctc tttgaaacga cacctattca 4140
cgaatttaat gaaactagaa tagaaaagga agaaattatt ggtaaaagca ttaaagaaac 4200
cttgaagac ctctactctc aaagagtggg tgaagctccc ggaatcatca ttgaagctga 4260
tgaagttggg gatgtcagaa tggccaaata caagctcatg aaccaaagga ctctgagat 4320
ccagaaggaa gaagttatca gagctgacct tggaacata atgatgaact tgctttccca 4380
aagagactgc aaaaaaagg agatatttat cagtgaagag gagaaggga atgtcaattt 4440
tactaaaacc cagttattaa acagatcaat ggaattccat gctgaaaagg aagagatagt 4500
aagaggggat gtaaaacaag caatccaaaa gctgttctct gaggaaaggt gtgcaaagag 4560

29 / 33

aggcatatta attcaagaag atgaaaaggg agatgttaac atgactatct attgtcttct 4620
tcatgagaat gctggcgaca agactaagcg tgaagacata ctgggaggtg atgtgagaat 4680
cactattcat aacctgttgt cttccgcac aaatgataaa atatctgaaa ggacaaaaat 4740
cgatgcacg gagaggggaa atgttcagtt cttcacaaca tgcataaaaa ctggagcttt 4800
ggattacctc aagcaactcc aaacagggtc aaatgaaaca ctcacagcta gaaagcaaga 4860
aggggaggaa gaaataattg gtggtgatgt tgagggaaca aaattcttac taaagaaaag 4920
acagtcttct attgaacgca ctgttagtga aactgatatc atcccaggag atgtgcgtaa 4980
tacagttaaa gtcttcatga cggagcccca gagtgcacat ttttaagacag cgaaagaaga 5040
gattgtaaaa ggtgatttga aatcaaccct gaattctctc aaccaggcca tgaatcagaa 5100
agtagtggct aaaacagaag atattatgaa agatgacaag gcagctatac tcaagtcact 5160
taaggagtca ggtggcagac agaaagaaca taaacaatct gctagcatct ctagtatat 5220
tgggcaagct attgagtgcc ttgaaaagge cacaataca aggacagaaa tattgaaaaa 5280
ggagctgata ttagatgac ttaaaacac attaggtct ttgaaagaag aacaatacag 5340
tttcaaagag gttggtaaac agggaatggt caaagatgta ctaggattct cagagagaca 5400
agaactaggg attcatccag cagctgtcca gagagagaaa aaaagccttc ttcaaccagt 5460
gccaggacca tgtgagccag caatcaggca gcaagcagga ccaggccctc ttgatgaagc 5520
tacacagaaa tcttgcacg ggtctttaac agaagaaaga actgaggcta atcttcccaa 5580
agcccctaag ggcactgtaa agattgtcat tgatcgagaa caaacaacg atgtcttga 5640
gaaaagcctt aggaaaatgt ctaattcaga acatagagct atgaaaaatg ttttagacat 5700
gggtgacaga aggggtgtct ggacagagag caaagagtgt ctgtgtagt acgaccatat 5760
gagcaaatac gtaagtcaa gcatgtcaag gaagaaaagt ctaaagacca agaatcaga 5820
gaatgtgaga gaatcgaagg acgatgtgag ctccaccag tctgtggata aacatttag 5880
gaagcaacag actcaaaact gtgaactggg gaaggatcac cagaagtctc agttccagga 5940
ttctatgag aagaatcaga aaaataccca aacatttag atgtcagcag aaacccaaag 6000
ttacagacca gaccctacc aacatccagt cagcaatcca gctggagaaa cgcttgagat 6060
gacaagggac tttcagaagc aagccttgat aagacaggaa aagcagaatt ctaataaaga 6120

30 / 33

tatgaggaaa aatgacatgg gccttcaacc tctgcctgta gggaaggacg cacacagtgc 6180
accaggagtg acagtctctg ggaaaaacca caaaagaact caggcacctg acaagaaaca 6240
gagaattgat gtttgtctag aaagccagga ctttctaata aagacaaata cttccaagga 6300
gttaaaaatg gcaatggaga ggctccttaa tccagtcaac ctttaccctg actgtggtgt 6360
aaaagaaaat gaggacgccc ttcctcctcc atctccccct cctcctcctc cttccaatgc 6420
gtcatctgaa attgaatttc ctctccctcc tccaccacct ataatgctgt tgctgaaaa 6480
aatgagttt cctccctcat caccacaga gaagtcaagg gctgaacttg agagcctccc 6540
aaccctgct cttcctccac caccaggaga tgagaaatct gatcaggaat gtctaccaac 6600
atccctacct cctccccctc ccacagctcc atcccaacca gcacatcttc tttcctcctc 6660
tgtttttagaa catcacagtg aagcattttt acaacagtat tccgaaaag aaaccttgga 6720
ctctcatcag cttcactcac aggctaaaat cctaacagga aaatcaccac ccccaacact 6780
ccccaaacc aaacttcccg agagaatcaa agctaagatg agccaggatt caccaagcgg 6840
tgaattggaa agatctctgt cagatgtgga aattaaaact accctctcaa aggatcagaa 6900
aagttcgctg gtggcagaaa gccgtgagca cacagaggcc aagcaagaag tattccgaaa 6960
aagccttgga agaaaacage tgtcaattag ctctgcaaac tccctctctc agacagttcc 7020
agaaatccca gcaccaagg aaaaacagac agcaccctt gttaaattctc actcattccc 7080
atcaggttca gaacaacaaa gtcctaagcc ttacatgaga aaatttaaga cacccttaat 7140
gattgcggaa gaaaaatata gacagcaaag ggaagagctt gagaaacaga gacgggagag 7200
ttcttgccat agcatcatca aaacagaaac ccagcaccgc agcttatcag agaaagagaa 7260
agaaacagag ttacaaaaag cagctgagge aatgtccact ccagaaagg attcagactt 7320
cactagggca cagcccaacc tggaacctaa aagcaaggct gtgatcgcca gtgaatgctc 7380
tgaaagccag ctctctacag cttccgcatt gacagtcgct accgagaggc tccagcatgt 7440
tctagccgct tcagacgata agcttaccct gcgacgggaa ggacacaga actcaagtga 7500
caccctacaa tcgaaaacag cttgtgagat taaccagagt cacaaggaat gtaggacaga 7560
gcaaacattt gagcaacacg tggagaagtt gcccttcccc caaaccaaac ccatttcccc 7620
gagtttcaaa gtgaaaacta tcaggcttcc agctctagat catacgtga ctgaaacaga 7680

31 / 33

tctcagttct gaacgccg taaagcaatc cgaaattgac gttcaaacca gtactaaaga 7740
aatgaataag gaaattaaga aaaccgaagt gagcacacag tgtgataata agcaatctgt 7800
ggctgaaaaa tattttcaat tacctaaaac agagaaacgg gtgacggtac aaatgcccaa 7860
agactatgca gcgaaaagtc atcaaagcaa actccaaaca gttcccaaga agcatggagg 7920
attgggggag tttgacagag ggaatgtcct ggggagggaa ggaaaaaatc aggactcctc 7980
catgagcagt acaaaagaaa gcagggtaat agttgaaaga aagcaagaac atctacagga 8040
ccagagcgta ccaaggtttag tccaacaaaa gattatcggt gaaagcctgg actcacgggt 8100
tcagaatddd cagcagacac aaacacaaac ttctaggatt gagcataaag aactgtccca 8160
accttacagt gagaaaaaat gtcttagaga caaggacaaa caacaaaaac aggtctcctc 8220
taacactgac gattcaaagc aagagataac acaaaaacaa tcttcatttt cctctgtgag 8280
agaatcccag caggatggag aaaaatgtgc cataaatata ttggaattct tgagaaaacg 8340
tgaagaacta cagcagattd tgtctagggt aaaacagtdt gaagcagatt caaataaaaag 8400
tggccttaaa acatttcaga cactgttaaa tattgtctcg gtgtggctga taagtgagga 8460
gaaaagagaa tatggagttc gtgttgccat ggagaataat ttagaaaaag tcaaagaaga 8520
aataatacat attaaaactc aagcggagga gatgatcggt cactgtgaac acgtaattcg 8580
aacagccatg atggcttccc aaacaggaaa gcagaaagat aaacctacca atcttaatga 8640
aatgccactg aaagtgtcta atgttaattct cagctctcat aaaggcactg aacagaaaga 8700
aagtaaaatt gtagaagaaa aattagcatc ccgccaagta gcaaccatt ctgaggcagc 8760
aactcataat cctgctaaaa catatcagga ggctaagggg gacgatagta agatggctcc 8820
tcctcttttg aaaactcgcc caccatcacc aactttcact accatcgaat ccactgcccg 8880
ccgagcagaa acatccacta agagttagct ttctcagtc cctaaaaata acagtttgtt 8940
tgaacctcta ccagaagac ccatggagca tacatctagg cttcccagaa caagtacatc 9000
accttcccca ccaaggagtc gttcagaaca acttgtcaga ctcaaagaca ccacggccag 9060
gtagccaaa ggcactatcc cttgttcacc aggaaccccg gttccagttg tcgagaagag 9120
atctgaagtt gtcatgtctc cagccacact ccgcaggcaa atcaagatag aaagccgtgg 9180
cggggactcc ccaccacca tcacaatacc tgtgagtgta aaccacatg tcgtcagttg 9240

3 2 / 3 3

ttccttcaga gaatcagtag acgtcaaga ggcagtgaag aaaacagaaa aaacagagac 9300
gtacgttcat aaagacaaaa agaattctgt cagtagcgca atgccagaga ctgaaagcta 9360
tgacgcagtt gaaatcatcc gcaaggtgga agggcccccac ctatcagaac acagggagag 9420
atttgaagcc accaatcaaa ctgttcaaat ggctgaacat tttctgaatg gccacgaaaa 9480
tgaagtaaac agatggttta gggaatttga gaatggccca gttttcggag caaagacaga 9540
gagaagagct tatgcaaagtg gcgaaataaa ccacaacatg aaacaagaga gtcatacgtt 9600
ttgcaaggag gaatttggat tagaatcttc tgaaactgct aattttacag gcttttctta 9660
cagacatcct agagagcatc gagcaaaagc cctgcaacg cagcccaggg ttactctga 9720
agccagagct ctcaatgagc attttttgag cgtggatgcg ttcgacagtc agattgtaga 9780
gtcacaggta gcaacctcat catcacggag ctacagaggca ggcagatctg gatttgattt 9840
taagcatgcc ccaccgacct atgaagatgt catcgctggc cacatcctag atattgcaga 9900
ttcgcttaca aacctcagac ggaattttca aaagacatgg caggagagtg aaagagtttt 9960
taagagcgtg ggatatgaaa cctcggtatgc acatgcgaca gaaatgagca gggccttcca 10020
ggaggaattg gcctttttga gtgaaactgt tgggtccaaga caaggaaatc tgcataattt 10080
gtcaaaagac ggtttatcca atggagtgc tctagcaga ccagcagaat tttcataaat 10140
cttgcttcag atgccaccat tgcagcagta aactgagttt gggaaattac gcatcacttc 10200
acggacaaat atactgcaag cctcacttta aacaactttt caagtctaaa ggaaattatg 10260
atgaaggttt tggacacaag caacataaag accggtggaa ttgcaaaaac caaagcagct 10320
tagttgattc tattcccagc ggagagcccc atgctcggga aaacctaca gcagatatcc 10380
tcttgcttgg ggatcttgct gtacatgcag acgcttgtaa cagcaagcgg caagacaatg 10440
gtttgagaaa atggggggag aggggggaaat taaaaattgt ttggcctccc tgtcaggaga 10500
tgcctaagaa aaactctccc cctgaggaag aactcaaagt gaataaagct aaatggccac 10560
ctgagttgac catcctgtt ccctcagaat ttaaaaggga gtcactgacc gaacacgtga 10620
aaatgttga gagtcagggg caagaacaag atcacctccc tgaattgcaa cctgccaac 10680
gcatttgtca gaaagaggac attacaggca tcaaagaaat aaaagggtac gaagaaagaa 10740
atgatgagaa agaagcaaag ggaaaggcgc aggatacgct gaaagatgca gagggcttga 10800

33 / 33

ggagtaagag aaaaagtggg atggagctta acgaccataa tgcgcatgct cagagtgatg 10860
gaaaggaaaa gaatgctcgt gctaataaac ctgacagtgc agacatttta caagttacaa 10920
acaccgatga tgacgatgag gtggggccag aaaatcatag ggagaacttc aataacaata 10980
acaataacaa ttctgtagct gtctcatcct tgaataatgg caggcagcag acatctatct 11040
cagaatatcc tcatgtacta cagacagcca gtgaagcaaa ctattacaca aatgaatacc 11100
aaattaaaaa gtttaacaat gcctctagaa tctcagagtt actgggtata tttgagtctc 11160
aaaagtcgtc ctccaagaat gtcttagcct tggctctgga gagcacggct gacagaggga 11220
ctgcaggcag tcccatgcag ctggcactgg agcccggctt ccagcagggc ttatcagtta 11280
aaggggaaag ccttgtagtc tctaacgaag taaaccctt acacattaaa ggaaaccatg 11340
aaaataacaa gaatgtacac cttttcttct ctaacactgt gaaaatcact tctttttcca 11400
agaaacataa catccttggg tgtgatttaa tagattctgt tgatcaactt aaaaatatgt 11460
catgcttgta ttttaagagaa ctcgggaaaa atgtcaaatg ctggcatggt gaaactgcag 11520
gagcggtcgc gcatggtgga aaaatgtgtt ttgatgctca gagccaagag agtgcggcta 11580
agcctgtgtt tcccagcatg cagtgccagg ctcaacatct gactgtggaa gagcagatta 11640
aacgggacag gtgctacagc gacagtgagg ctgactgaaa agtctttggc cacttgtagt 11700
tcatgctcgg gcaactgagg agcctgttct cggagaagac ctcgggatca tcgctaacct 11760
tttgatgagt ttgtaaagat cacgtttcat aatctacca ttacagcac attatttctt 11820
gtatcgact ccataatcct tttccacat tcaattgaga ctagtttgga tcttaatgaa 11880
atgctgagat gaaacatggt gaccgtgttt tcttctcaaa tggcgcattg gctacggttt 11940
tctgtatctt aaagtgggag agagtctgca ccgctggtgt tcatcgccac tcttatacct 12000
tctctatatt ttctgatgaa ataaaatttt gtcaactgag atgcaaaaaa aaaaaaaaaa 12060
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 12120
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaa 12178

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP03/03613

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/78, A61K38/39, A61P9/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
GENBANK/DBBJ/GENESEQ, PIR/SWISSPROT, BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN),
JSTPLUS (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	INOUE S. et al., Identification of a novel gene involved in the pathogenesis of cardiac hypertrophy in rats. Circulation Journal, 31 March, 2002 (31.03.02), 66(Supplement 1), page 765	1-7
X A	WO 01/74901 A2 (STANTON Lawrence W), 11 October, 2001 (11.10.01), & US 2002/110804 A	1-3 4-7
A	JOSHUA E.L.G. et al., Nitric oxide mediated induction of cytochrome c oxidase mRNA and protein in a mouse macrophage cell line. Neuroscience Letters, 200, 288, pages 107 to 110	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 April, 2003 (24.04.03)

Date of mailing of the international search report

13 May, 2003 (13.05.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/03613

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GEORGE I.G. et al., NO increases permeability of cultured human cervical epithelia by cGMP-mediated increase in G-actin. Am.J.Physiol.Cell.Physiol., 2000, 278, pages C942 to C952	1-7
A	KATAOKA C. et al., Important role of Rho-kinase in the pathogenesis of cardiovascular inflammation and remodeling induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. Hypertension, 2002 February, 39(2), p.245-50	1-7
A	TAKAORI K. et al., Inhibition of nitric oxide synthase causes cardiac phenotypic modulation in rat. Eur.J.Pharmacol., 12 March, 1997 (12.03.97), 322(1), pages 59 to 62	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/12, C07K14/78, A61K38/39, A61P9/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GENBANK/EMBL/DDBJ/GENESEQ

PIR/SWISSPROT

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPLUS (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	INOUE S et al., Identification of a novel gene involved in the pathogenesis of cardiac hypertrophy in rats. Circulation Journal, 2002. 03. 31, 66 (Supplement 1), p. 765	1-7
X	WO 01/74901 A2 (STANTON Lawrence W)	1-3
A	2001. 10. 11 &US 2002/110804 A	4-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24. 04. 03

国際調査報告の発送日

13.05.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伏見 邦彦

印

4B

9838

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JOSHUA E L G et al., Nitric oxide mediated induction of cytochrome c oxidase mRNA and protein in a mouse macrophage cell line. Neuroscience Letters, 2000, 288, p. 107-110	1-7
A	GEORGE I G et al., NO increases permeability of cultured human cervical epithelia by cGMP-mediated increase in G-actin. Am J Physiol Cell Physiol, 2000, 278, p. C942-C952	1-7
A	KATAOKA C et al., Important role of Rho-kinase in the pathogenesis of cardiovascular inflammation and remodeling induced by long-term blockade of nitric oxide synthesis in rats. Hypertension, 2002 Feb, 39 (2), p. 245-50	1-7
A	TAKAORI K et al., Inhibition of nitric oxide synthase causes cardiac phenotypic modulation in rat. Eur J Pharmacol, 1997 Mar 12, 322 (1), p. 59-62	1-7

特許協力条約に基づく国際出願願書

原本（出願用） - 印刷日時 2003年03月24日 (24. 03. 2003) 月曜日 18時18分11秒

VIII-5-1	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て（規則4.17(v)及び51の2.1(a)(v)）	本国際出願に関し、 アンジェス エムジー株式会社は、本国際出願の請求項に記載された対象が以下のように開示されたことを申し立てる。
VIII-5-1 (i)	開示の種類	刊行物
VIII-5-1 (ii)	開示の日付:	2002年03月31日 (31. 03. 2002)
VIII-5-1 (iii)	開示の名称:	Circulation Journal Vol. 66 Supplement 1, p. 765
VIII-5-1 (iv)	開示の場所:	
VIII-5-1 (v)	本申立ては、次の指定国のためになされたものである。:	すべての指定国